

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 01 October 1998 (01.10.98)	
International application No.: PCT/EP98/01653	Applicant's or agent's file reference: 15404P WO
International filing date: 20 March 1998 (20.03.98)	Priority date: 21 March 1997 (21.03.97)
Applicant: GROLL, Michael et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
24 August 1998 (24.08.98)☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
_____2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------

Copy for the Elected Office (EO/US)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP98/01653

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WEICKMANN, H.
Kopernikusstrasse 9
D-81679 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 05 February 1999 (05.02.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 15404P WO	
International application No. PCT/EP98/01653	
International filing date (day/month/year) 20 March 1998 (20.03.98)	

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
Sandhofer Strasse 112-132
D-68305 Mannheim
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH
Sandhofer Strasse 112-132
D-68305 Mannheim
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Beate Giffo-Schmitt

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WEICKMANN, H.
Kopernikusstrasse 9
D-81679 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 03 September 1999 (03.09.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 15404P WO	
International application No. PCT/EP98/01653	
International filing date (day/month/year) 20 March 1998 (20.03.98)	

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☐ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

Name and Address

 ROCHE DIAGNOSTICS GMBH
 Sandhofer Strasse 112-132
 D-68305 Mannheim
 Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person
 ☒ the name
 ☒ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

Name and Address

 MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
 FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
 Hofgartenstrasse 8
 D-80539 München
 Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
 ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority
 ☒ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority
 ☐ other:

 The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Ellen Moyse

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

E 1. OKT. 1999

Frist:
Patentanwälte

WEICKMANN, H
 Kopernikusstrasse 9
 D-81679 München
 ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 22 September 1999 (22.09.99)	
Applicant's or agent's file reference 15404P WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP98/01653	International filing date (day/month/year) 20 March 1998 (20.03.98)
Applicant al	MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. et

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

BR,CA,CN,GB,JP,KP,KR,NZ,PL,US


The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,EP,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BY,CH,CU,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,GE,GH,GM,GW,HU,ID,IL,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZW,OA

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Jean-Marie McAdams  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

08/381286

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 15404P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 98/01653	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 20/03/1998	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 21/03/1997
Anmelder BOEHRINGER MANNHEIM GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

- ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
- ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
- ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
 - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
 - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
 - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
 - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
- Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
 - ☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.

VERFAHREN ZUR REINIGUNG UND KRISTALLISIERUNG VON PROTEASOM

- Hinsichtlich der Zusammenfassung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
- Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:
 - Abb. Nr. 2 ☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen ☐ keine der Abb.
 - ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
 - ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
 weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. **20 partiell**
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
Anspruch 20 wurde wegen Fehlens der technischen Offenbarung unvollständig gesucht (Art. 6, PCT)
3. ☐ Ansprüche Nr.
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

PATENTANWÄLTE
European Patent Attorneys
European Trade Mark Attorneys

DIPL.-ING. H. WEICKMANN
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKA
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG
DIPL.-PHYS. B. RUTTENSPERGER

08/381286
POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN
KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN
TELEFON (089) 45563 0
TELEX 522 621
TELEFAX (089) 45563 999
E-MAIL email@weickmann.de

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20
Switzerland

IHR ZEICHEN / YOUR REF.

amtliches Aktenzeichen:
PCT/EP98/01653
Anmelder bzw. Inhaber:
Roche Diagnostics GmbH

UNSER ZEICHEN / OUR REF.
15404P WO/WWei

DATUM / DATE

27. Aug. 1999

Auf

Die oben genannte internationale
Patentanmeldung wurde von Roche
Diagnostics GmbH übertragen auf

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung
der Wissenschaften e.V.
Hofgartenstr. 8
D-80539 München
DE

Eine Übertragungserklärung sowie eine durch
die Max-Planck-Gesellschaft unter-
zeichnete Vollmacht folgen.

Die im September 1999 fälligen nationalen
Phasen sollen bereits im Namen der Max-
Planck-Gesellschaft eingeleitet werden.
Daher wird gebeten, uns die amtliche
Mitteilung der Registrierung der Änderung
baldmöglichst zukommen zu lassen.

Dr. W. Weiß

BANKVERBINDUNGEN:
BANK ACCOUNTS:
VAT-ID. NR. DE 130 753 315

HYPOVEREINSBANK
80333 MÜNCHEN, POSTFACH 1
KONTO 208 401 (BLZ 700 202 70)

POSTBANK MÜNCHEN
KONTO 77 46 -804 (BLZ 700 100 80)

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

08/381286

PCT 98/01653

Internationales Aktenzeichen

20 MAR 1998

(20. 03. 98)

Internationales Anmeldedatum

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS
DEMANDE INTERNATIONALE PCT

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) 15404P WO

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Proteasomenstruktur und Verfahren zur Identifizierung von
Proteasom-Inhibitoren

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung.
Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Boehringer Mannheim GmbH
Sandhofer Str. 112-132
D-68305 Mannheim-Waldhof
DE

☐ Diese Person ist
gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder
für folgende Staaten:

☐
alle Bestimmung-
ungsstaaten
☒
alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
der Vereinigten Staaten von Amerika
☐
nur die Vereinigten
Staaten von Amerika
☐
die im Zusatzfeld
angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung.
Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

GROLL, Michael
Türkenstr. 11
D-80333 München
DE

Diese Person ist:

☐

nur Anmelder

☒

Anmelder und Erfinder

☐

nur Erfinder (Wird dieses Kästchen
angekreuzt, so sind die nachstehenden
Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder
für folgende Staaten:

☐
alle Bestimmung-
ungsstaaten
☐
alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
der Vereinigten Staaten von Amerika
☒
nur die Vereinigten
Staaten von Amerika
☐
die im Zusatzfeld
angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder
vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer
Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung.
Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Weickmann, H., Weickmann, F.A., Huber, B.,
Liska, H., Prechtel, J., Böhm, B., Weiß, W.,
Herzog, M., Tiesmeyer, J.
Kopernikusstr. 9, D-81679 München, DE

Telefonnr.:

089 / 4 55 63 - 0

Telefaxnr.:

089 / 4 70 50 68

Fernschreibnr.:

5 22 621 wepat d

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld
eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

HUEER, Robert
Schlesierstr. 13
D-82110 Germering
DE

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☒ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

DITZEL, Lars
Asterstr. 12
D-80689 München
DE

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☒ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

ENGH, Richard
Herbststr. 4
D-82234 Wessling
DE

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☒ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):
US

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☐ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☒ AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Deutschland | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

- ☐
- ☐
- ☐

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH

Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. ☐

Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:

Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) Europäische Patentanmeldung Staat u.a.] DE	(21. 03. 97) 21. März 1997	97 104 877.2	EP 8
(2)			
(3)			

Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):

☐ Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt):

ISA /

Frühere Recherche: Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.

Staat (oder regionales Amt):

Datum (Tag/Monat/Jahr):

Aktenzeichen:

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE

Diese internationale Anmeldung umfaßt:

1. Antrag : 4 Blätter
 2. Beschreibung : 27 Blätter
 3. Ansprüche : 3 Blätter
 4. Zusammenfassung : 1 Blätter
 5. Zeichnungen : 11 Blätter
 Insgesamt : 46 Blätter

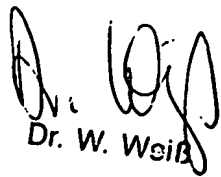
Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. ☐ Unterzeichnete gesonderte Vollmacht
 2. ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht
 3. ☐ Begründung für das Fehlen der Unterschrift
 4. ☐ Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen):
 5. ☒ Blatt für die Gebührenberechnung DM 5338,-
 6. ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen
 7. ☐ Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)
 8. ☐ Sonstige (einzeln auflisten):

Abbildung Nr. 2 der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.


 Dr. W. Weiß

20. März 1998

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	20 MAR 1998	(20. 03. 98)	2. Zeichnungen <input checked="" type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:			
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:			
5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde:	ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben	

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

08/381286

Welckmann

PCT 16. JUNI 1999

Frist:

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSCHÜDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

An:

WEICKMANN, H.
Kopernikusstrasse 9
D-81679 München
ALLEMAGNE

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

15. 06. 99

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
15404P WO

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP98/01653

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
20/03/1998

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
21/03/1997

Anmelder

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung
beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d
Fax: (+49-89) 2399-4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Hingel, W

Tel. (+49-89) 2399-8717



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 15404P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/01653	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 20/03/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 21/03/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N9/60		
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
- Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 24/08/1998	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 15. 06. 99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter Vollbach, S Tel. Nr. (+49-89) 2399 8715 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/01653

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-27 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-20 eingegangen am 11/02/1999 mit Schreiben vom 11/02/1999

Zeichnungen, Blätter:

1/8-7/8,8/8 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 20.

Begründung:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/01653

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☒ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 20 sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-5,8-14,16-20 Nein: Ansprüche 6,7,15
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche Nein: Ansprüche 1-5,8-14,16-20
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-20 Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

1. Die vorliegende Anmeldung hat ein Verfahren zur Isolierung von eukaryotischen kristallisierbaren Proteasomen und die durch dieses Verfahren erhältlichen Proteasomen zum Gegenstand. Weiterhin betrifft die Anmeldung die Verwendung der aufgereinigten Proteasomen zur Identifizierung von Inhibitoren.

2. Eukaryotische Proteasomen wurden bereits aus den verschiedensten Organismen isoliert und zum Teil auch kristallisiert. So beschreibt z.B. D1 (EPA-0 345 750) die Isolierung von Proteasomen aus Mensch, Huhn, *Xenopus laevis* und Hefe. Das Aufreinigungsverfahren des D1 führt zu einer homogenen Proteasomenfraktion. In diesem Dokument werden zudem Antikörper und Inhibitoren bereitgestellt. Weiterhin betreffen auch die Dokumente D2 (J. Biochem., vol. 117, Morimoto et al., 1995) und D3 (Mol. Cell, vol. 4, Hwang et al., 1994) die Aufreinigung von Proteasomen aus Rinderleber und Rattenleber und die Kristallisierung dieser Proteasomen. Die Anmelderin wird in Kenntnis gesetzt, daß im Recherchenbericht weitere relevante Dokumente zitiert sind.

Im Hinblick auf den oben genannten Stand der Technik gelten die folgenden Einwände:

Die Verfahrensansprüche 1 und 2 sind im Hinblick unterscheiden sich von dem in D1 beschriebenen Verfahren dadurch, daß die Verfahrensschritte d, f und/oder i jeweils zwei Bestimmungen der proteolytischen Aktivität umfaßt. Dieser Unterschied allerdings kann erfinderische Tätigkeit für das Verfahren nicht herstellen, da der Fachmann weiß, daß durch eine weitere Selektion mittels eines Inhibitors eine reinere Fraktion zu erhalten ist, welche die Kristallisation erleichtert oder die Resolution erhöht. Daher kann eine erfinderische Tätigkeit für die Ansprüche 1 und 2 nicht anerkannt werden (Artikel 33(3) PCT). Die abhängigen Ansprüche 3-5 enthalten keine Merkmale, die erfinderische Tätigkeit für das Reinigungsverfahren etablieren könnten. An diese Stelle wird die Anmelderin in Kenntnis gesetzt, daß das Merkmal " Testen der Fraktionen mittels zwei Bestimmungen" wie im Anspruch 1 formuliert keine Auswirkung auf da resultierende Produkt hat. Daher sind die Ansprüche, die sich auf die Proteasomen beziehen, entweder nicht neu im Hinblick auf den zitierten Stand der Technik (Ansprüche 6,7) oder nicht erfinderisch im Sinne des Artikel 33(3) PCT (Ansprüche 8-14). Auch die Verwendung der Proteasomenpräparation gemäß des Anspruchs 15 ist nicht mehr neu gegenüber D1 und die Verwendung gemäß der Ansprüche 16-20 ist nicht erfinderisch gegenüber der Dokument D2 und D3.

3. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß im Stand der Technik bereits Methoden beschrieben sind zur Aufreinigung von Proteasomen aus eukaryotischen Zellen, Kristallisierungen bereits durchgeführt sind und Inhibitoren identifiziert wurden. Daher ist nicht erkennbar, welcher Anmeldgegenstand die Erfordernisse der Artikel 33(2) und 33(3) PCT erfüllen würde.

5

Neue Ansprüche

1. Verfahren zum Gewinnen einer aufgereinigten eukaryontischen Proteasomenpräparation, umfassend die Schritte:
 - 10 (a) Herstellung eines Rohextrakts durch Aufschluß von eukaryontischen Zellen,
 - (b) Abtrennung unlöslicher Bestandteile aus dem Rohextrakt,
 - (c) chromatographische Auftrennung in Fraktionen über ein Ionenaustauschermedium,
 - 15 (d) Testen der in Schritt (c) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen,
 - (e) chromatographische Auftrennung über Hydroxyapatit,
 - (f) Testen der in Schritt (e) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen,
 - 20 (g) Konzentrierung der vereinigten Fraktionen,
 - (h) chromatographische Auftrennung über ein Gelfiltrationsmedium und
 - (i) Testen der in Schritt (h) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen,
 - 25 wobei, das Testen der Fraktionen in Schritt (d), (f) oder/und (i) jeweils zwei Bestimmungen der proteolytischen Aktivität umfaßt, wobei eine in Abwesenheit und die andere in Gegenwart eines Proteasomeninhibitors durchgeführt wird.
 - 30
2. Verfahren nach Anspruch 1
dadurch gekennzeichnet,
daß man Hefezellen verwendet.
- 35
3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Lactacystin als Proteasomeninhibitor verwendet.
- 40

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens einer der chromatographischen Trenn-
schritte in einem FPLC-System durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
weiterhin umfassend das Kristallisieren der aufgereinig-
ten Proteasomenpräparation.
6. Aufgereinigte eukaryontische Proteasomenpräparation,
erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1
bis 4.
7. Aufgereinigte eukaryontische Proteasomenpräparation nach
Anspruch 6 in kristallisierbarer Form.
8. Aufgereinigte kristallisierte eukaryontische Proteasomen-
präparation,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine kristallographische Analyse bei einer Auflö-
sung von 0,28 nm oder höher erlaubt.
9. Aufgereinigte kristallisierte eukaryontische Proteasomen-
präparation nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine kristallographische Analyse bei einer Auflö-
sung von 0,24 nm erlaubt.
10. Präparation nach Anspruch 8 oder 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Kristall einen Proteasomeninhibitor enthält.
11. Präparation nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Inhibitor ein Tripeptid-Aldehyd oder Lactacystin
ist.

12. Präparation nach einem der Ansprüche 6 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie ein Proteasom aus einer Hefe umfaßt.
- 5 13. Präparation nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie ein Proteasom aus *Saccharomyces cerevisiae* um-
faßt.
- 10 14. Präparation nach einem der Ansprüche 6 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen Komplex aus 28 Untereinheiten umfaßt, der
jeweils 2 Moleküle von 7 verschiedenen α -Typ-Unterein-
heiten und 7 verschiedenen β -Typ-Untereinheiten enthält.
- 15 15. Verwendung der aufgereinigten eukaryontischen Proteaso-
menpräparation nach einem der Ansprüche 6 bis 14 zur
Identifizierung und Gewinnung neuer Proteasomeninhibito-
ren.
- 20 16. Verwendung von Daten aus der Kristallstruktur von kri-
stallisierten eukaryontischen Proteasomenpräparationen
nach einem der Ansprüche 8 bis 14 zur Identifizierung und
Gewinnung neuer Proteasomeninhibitoren.
- 25 17. Verwendung von Kristallstrukturdaten aus dem Bereich der
Proteasomentaschen S1 der Untereinheiten β 1/PRE3, β 2/PUP1
oder/und β 5/PRE2 zur Identifizierung und Gewinnung neuer
Proteasomeninhibitoren.
- 30 18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17 in einem
computergestützten Modellprogramm.
- 35 19. Verwendung nach Anspruch 18, umfassend einen Schritt des
Homologiemodelling, indem die Kristallstrukturdaten eines
Hefeproteasoms mit Aminosäuresequenzen aus dem humanen
Proteasom modifiziert werden.

20. Verfahren zur Bereitstellung neuer Proteasomeninhibitoren,

dadurch gekennzeichnet,

daß man aufgrund von Daten aus der Kristallstruktur von kristallisierten eukaryontischen Proteasomenpräparationen nach einem der Ansprüche 8 bis 14 Verbindungen identifiziert, die eine zur Proteasomentasche S1 der Untereinheiten $\beta 1$ /PRE3, $\beta 2$ /PUP1 oder/und $\beta 5$ /PRE2 komplementäre dreidimensionale Struktur aufweisen.

10

vo 09.02.99 15:13

GEÄNDERTES BLATT

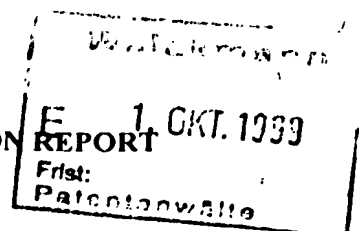
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

(PCT Article 36 and Rule 70)



Applicant's or agent's file reference 15404P WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP98/01653	International filing date (day/month/year) 20 March 1998 (20.03.1998)	Priority date (day/month/year) 21 March 1997 (21.03.1997)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9/60		
Applicant ROCHE DIAGNOSTICS GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 4 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 24 August 1998 (24.08.1998)	Date of completion of this report 15 June 1999 (15.06.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/01653

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-27, as originally filed.
 pages _____, filed with the demand.
 pages _____, filed with the letter of _____.
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed.
 Nos. _____, as amended under Article 19.
 Nos. _____, filed with the demand.
 Nos. 1-20, filed with the letter of 11 February 1999 (11.02.1999),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/8-7/8,8/8, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/01653

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 20

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. _____
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 20
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

See supplemental sheet

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 98/01653

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-5, 8-14, 16-20	YES
	Claims	6, 7, 15	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-5, 8-14, 16-20	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The subject of the present application consists in a process for isolating eukaryotic, crystallizable proteasomes and in the proteasomes that may be thereby obtained. The application also pertains to the use of purified proteasomes to identify inhibitors.

2. Eukaryotic proteasomes have already been isolated from a wide variety of organisms and in some cases also crystallized. For example, EP-A-0 345 750 (D1) describes the isolation of proteasomes from humans, chickens, *Xenopus laevis* and yeast. The purification process described in D1 yields a homogeneous proteasome fraction. D1 also describes the preparation of antibodies and inhibitors. Morimoto et al., 1995 (J. Biochem., Vol. 117) (D2) and Hwang et al., 1994 (Mol. Cell, Vol. 4) (D3) describe the purification of proteasomes from bovine and rat liver and the crystallization of these proteasomes. The applicant is advised that further relevant documents are cited in the search report.

In the light of the above-indicated prior art, the following objections arise:

Process Claims 1 and 2 differ from the process described in D1 in that process steps d, f and/or i each comprise

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 98/01653

two determinations of proteolytic activity. However, this difference cannot endow the process with inventive step, since a person skilled in the art would know that, by further selection using an inhibitor, a purer fraction could be obtained which would facilitate crystallization or improve resolution. Consequently, with respect to Claims 1 and 2 inventive step cannot be acknowledged (PCT Article 33(3)). Dependent Claims 3-5 do not contain any technical features capable of establishing the inventiveness of the purification process. The applicant is advised here that the feature "Testing fractions by means of two determinations", as formulated in Claim 1, has no effect on the resulting product. Therefore, the claims that refer to proteasomes are either not novel over the cited prior art (Claims 6 and 7) or lack inventive step within the meaning of PCT Article 33(3) (Claims 8-14). Moreover, the use of the proteasome preparation as per Claim 15 is no longer novel over D1 and the application as per Claims 16-20 does not involve an inventive step compared with D2 and D3.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 98/01653

Supplemental Box
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I I I

1. To summarize, methods of purifying proteasomes from eukaryotic cells have been described, crystallizations implemented and inhibitors identified in prior art. It is therefore impossible to discern which of the claimed subjects would meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

Claims

1. Process for isolating a purified eukaryotic proteasome preparation comprising the steps:
 - (a) production of a crude extract by lysing eukaryotic cells,
 - (b) separation of insoluble components from the crude extract,
 - (c) chromatographic separation into fractions by means of an ion exchange medium,
 - (d) testing the fractions obtained in step (c) and collecting the active fractions,
 - (e) chromatographic separation over hydroxyapatite,
 - (f) testing the fractions obtained in step (e) and collecting the active fractions,
 - (g) concentrating the pooled fractions,
 - (h) chromatographic separation over a gel filtration medium and
 - (i) testing the fractions obtained in step (h) and collecting the active fractions.
2. Process as claimed in claim 1,
wherein
yeast cells are used.
3. Process as claimed in claim 1,
wherein
each testing of the fractions in steps (d), (f) or/and (i) comprises two determinations of the proteolytic activity one of which is carried out in the absence and the other in the presence of a proteasome inhibitor.

4. Process as claimed in claim 3,
wherein
lactacystin is used as the proteasome inhibitor.
5. Process as claimed in one of the claims 1 to 4,
wherein
at least one of the chromatographic separation steps is carried out in a FPLC system.
6. Process as claimed in one of the claims 1 to 5,
also comprising the crystallization of the purified proteasome preparation.
7. Purified eukaryotic proteasome preparation obtainable by the process as claimed in one of the claims 1 to 5.
8. Purified eukaryotic proteasome preparation in a crystallizable form.
9. Purified crystallized eukaryotic proteasome preparation.
10. Preparation as claimed in claim 9,
wherein
the crystal contains a proteasome inhibitor.
11. Preparation as claimed in claim 10,
wherein
the inhibitor is a tripeptide aldehyde or lactacystin.

12. Preparation as claimed in one of the claims 7 to 11,
wherein
it contains a proteasome from a yeast.
13. Preparation as claimed in claim 12,
wherein
it contains a proteasome from *Saccharomyces cerevisiae*.
14. Preparation as claimed in one of the claims 7 to 13,
wherein
it contains a complex of 28 subunits which contains two molecules each of 7 different α type subunits and 7 different β type subunits.
15. Use of the purified eukaryotic proteasome preparation as claimed in one of the claims 7 to 14 to identify and isolate new proteasome inhibitors.
16. Use of data from the crystal structure of crystallized eukaryotic proteasome preparations as claimed in one of the claims 9 to 14 to identify and isolate new proteasome inhibitors.
17. Use of crystal structural data from the region of the proteasome pockets S1 of the subunits $\beta 1$ /PRE2, $\beta 2$ /PUP2 or/and $\beta 5$ /PRE2 to identify and isolate new proteasome inhibitors.
18. Use as claimed in one of the claims 15 to 17 in a computer-aided modelling program.

19. Use as claimed in claim 18, comprising a step of homology modelling in which the crystal structural data of a yeast proteasome are modified with amino acid sequences from the human proteasome.
20. New proteasome inhibitor,
wherein
it has a three-dimensional structure which is complementary to the proteasome pocket S1 of the subunits $\beta 1$ /PRE3, $\beta 2$ /PUP2 or/and $\beta 5$ /PRE2.

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ :

C12N 9/60

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/42829

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

1. Oktober 1998 (01.10.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/01653

(22) Internationales Anmeldedatum: 20. März 1998 (20.03.98)

(30) Prioritätsdaten:

97104877.2 21. März 1997 (21.03.97) EP

(34) Länder für die die regionale oder
internationale Anmeldung eingereicht
worden ist:

DE usw.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):
BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer
Strasse 112-132, D-68305 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GROLL, Michael [DE/DE];
Türkenstrasse 11, D-80333 München (DE). HUBER,
Robert [DE/DE]; Schlesierstrasse 13, D-82110 Germering
(DE). DITZEL, Lars [DE/DE]; Astenstrasse 12, D-80689
München (DE). ENGH, Richard [US/DE]; Herbststrasse 4,
D-82234 Wessling (DE).(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9,
D-81679 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB,
GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW,
ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.

Weickmann

E 15. MRZ. 1999

Frist:
Patentanwälte

(54) Title: METHOD FOR THE PURIFICATION AND CRYSTALLIZATION OF PROTEASOME

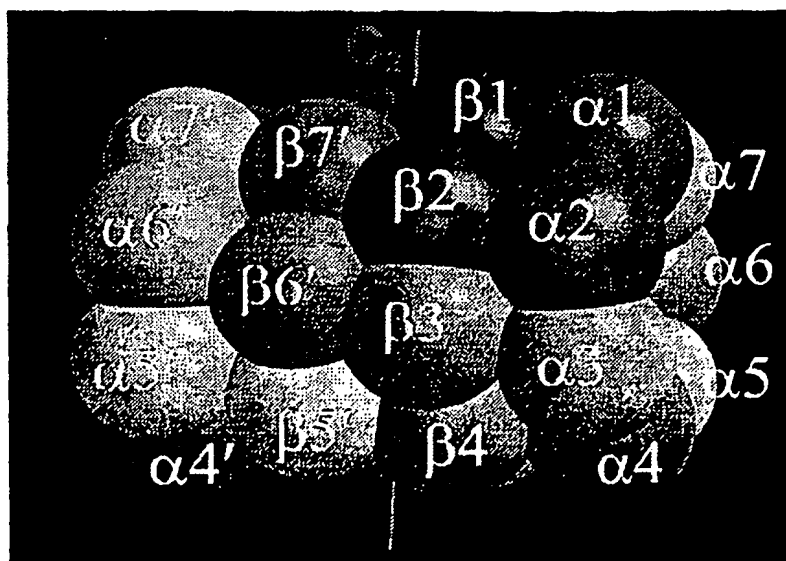
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR REINIGUNG UND KRISTALLISIERUNG VON PROTEASOM

(57) Abstract

The invention relates to a method for the production of a purified eucaryotic crystallizable proteasome preparation, and to the proteasome preparation obtained by this method. The invention also relates to a purified eucaryotic proteasome preparation in crystallized form. With the aid of crystal data from this proteasome preparation, new proteasome inhibitors can be identified and produced, in particular with the aid of computer assisted modelling programmes.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Gewinnen einer aufgereinigten eukaryontischen kristallisierbaren Proteasomen-Präparation und die durch das Verfahren erhältliche Proteasomen-Präparation. Weiterhin betrifft die Erfindung eine aufgereinigte eukaryontische Proteasomen-Präparation in kristallisierter Form. Mit Hilfe der Kristalldaten aus dieser Proteasomen-Präparation können neue Proteasomen-Inhibitoren, insbesondere mit Hilfe von computergestützten Modelling-Programmen identifiziert und gewonnen werden.



VERFAHREN ZUR REINIGUNG UND KRISTALLISIERUNG VON PROTEASOM

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Gewinnen einer aufgereinigten eukaryontischen kristallisierbaren Proteasomen-Präparation und die durch das Verfahren erhältliche Proteasomen-Präparation. Weiterhin betrifft die Erfindung eine aufgereinigte eukaryontischen Proteasomen-Präparation in kristallisierter Form. Mit Hilfe der Kristalldaten aus dieser Proteasomen-Präparation können neue Proteasomen-Inhibitoren, insbesondere mit Hilfe von computergestützten Modelling-Programmen identifiziert und gewonnen werden.

Das Proteasom ist das zentrale Enzym beim Proteinabbau sowohl im Cytosol als auch im Zellkern. Es ist an vielen biologischen Prozessen beteiligt, einschließlich der Entfernung abnormaler, fehlgefalteter oder falsch assemblierter Proteine, der Reaktion auf Stress (durch Prozessierung oder Abbau von Transkriptionsregulatoren), der Zellzykluskontrolle (durch Abbau von Zyklinen), der Zelldifferenzierung und metabolischen Adaption (durch Zerstörung von Transkriptionsfaktoren oder metabolischen Enzymen) und der zellulären Immunreaktion (durch Erzeugung antigener Peptide, die von MHC Klasse I Molekülen präsentiert werden). Für diese zellulären Funktionen, die auf einem Ubiquitin und ATP erfordernden Abbau von Proteinen beruhen, wird das 26S Proteasom benötigt, dessen Kern und proteolytische Kammer durch das 20S Proteasom gebildet werden.

Das 20S Proteasom aus dem Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* wurde durch Röntgenstrukturkristallographie bei einer Auflösung von 0,34 nm analysiert. Es hat eine zylindrische Form mit einer Länge von 14,8 nm und einem maximalen bzw. minimalen Durchmesser von 11,3 nm bzw. 7,5 nm. Es besteht aus 28 Untereinheiten, die in einem Partikel als 4 homoheptamere

- 2 -

Ringe $\alpha 7 \beta 7 \beta 7 \alpha 7$ mit D7 Symmetrie angeordnet sind (Löwe et al., (1995), Science 268, 533-539). Im T.acidophilum Proteasom ist der N-terminale Threoninrest der β -Untereinheiten die Bindestelle von inhibitorischen Peptidaldehyden und essentiell für die hydrolytische Aktivität. Auch Stock et al. ((1996), Current Opinion in Biotechnology, 7: 376-385) beschreiben die Struktur und Funktion von T.acidophilum Proteasomen. Eine Übertragung von T.acidophilum-Daten auf eukaryontische Proteasomen ist nicht möglich, da die Homologie der Proteasomen zwischen diesen Spezies zu gering ist.

Eukaryontische Proteasomen sind erheblich komplexer als das archaebakterielle Proteasom. So ist das 20S Proteasom aus Saccharomyces cerevisiae aus insgesamt sieben verschiedenen α -Typ und sieben verschiedenen β -Typ-Untereinheiten aufgebaut, die bereits kloniert und sequenziert wurden, vgl. z. B. Heinemeyer et al. (1994), Biochemistry 33, 12229-12237).

Die eukaryontischen 20S Proteasomen, z. B. aus Hefe und aus Säugern, sind hinsichtlich der Aminosäuresequenzen von Untereinheiten und ihrer durch Elektronenmikroskopie erkennbaren Grobstruktur sehr nahe verwandt. Die α -Typ und β -Typ Untereinheiten des Säuger 20S Proteasoms bilden eine geordnete und wohldefinierte Struktur (Kopp et al. (1995), J. Mol. Biol. 248, 264-272). In Säugerzellen können drei zusätzliche nicht essentielle Untereinheiten des 20S Proteasoms, die als LMP2, LMP7 und MECL1 bezeichnet werden, konstitutive Komponenten nach Induktion mit dem Cytokin Interferon γ ersetzen. Ihre Expression oder gezielte Deletion ändert die Peptidasespezifität des Proteasoms und die Expressionsstärke von MHC Klasse I Molekülen an der Zelloberfläche.

Hilt, Heinemeyer und Wolf ((1993), Enzyme Protein 47: 189-201) beschreiben den Aufbau von 20S und 26S Hefeproteasomen sowie die proteolytische Aktivität von β -Typ-Untereinheiten. Ferner werden die unterschiedlichen Funktionsweisen von 20S und 26S Proteasomen hinsichtlich des Stoffwechsels und der Differen-

zierung einer Zelle diskutiert. Kristallographische Daten von eukaryontischen Proteasomen werden nicht beschrieben.

In der Veröffentlichung Rivett et al. (1994), Methods Enzymol. 244, 331-350) und den darin enthaltenen Zitaten sind bisher zur Aufreinigung von Proteasomen verwendete Ausgangsmaterialien, z. B. Gewebe und Zellen von Säugern, wie Maus, Ratte, Mensch oder Rind, anderen Tieren, Pflanzen und Hefe aufgelistet.

10

Auch in der Patentliteratur finden sich zahlreiche Dokumente, die Proteasomen betreffen. So wird beispielsweise die Herstellung von eukaryontischen Proteasomen in EP-A-03 45 750, JP-A-05 292 964 und JP-A-06 022 759 beschrieben. Die dort offenbarten Proteasomen-Präparationen besitzen jedoch keine ausreichende Reinheit, um eine Kristallisierung zu ermöglichen.

Morimoto et al. ((1995), J. Biochem. 117, 471-474), Hwang et al. ((1994), Mol. Cells, Vol. 4, 273-275) und Perkins et al. ((1994), Journal of Struktural Biology 113, 124-134) beschreiben die Kristallisierung von eukaryontischen Proteasomen. Aufgrund der geringen Reinheit der Proteasomen-Präparationen werden lediglich Auflösungen von 0,44 nm, > ca. 5,0 nm bzw. 1,5 nm erreicht, so daß eine Strukturbestimmung oder ein Molecular Modelling mit diesen Proteasomen-Präparationen nicht möglich ist.

Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Proteasomenuntereinheiten werden beispielsweise in den japanischen Anmeldungen JP-A-04 077 497, JP-A-04 077 498, JP-A-04 117 283, JP-A-05 317 059, JP-A-07 255 476, JP-A-08 116 972, JP-A-08 205 871 und JP-A-08 217 796 sowie im japanischen Patent 40 51 896 beschrieben.

Inhibitoren für das Proteasom sind beispielsweise in JP-A-05 000 968, WO 92/20 804, WO 94/17 816, WO 95/24 914, WO 95/25

533, WO 96/13 266, WO 96/32 105 (Lactacystinanaloga) und US-A-55 80 854 (Peptidaldehydinhhibitoren) beschrieben.

Klafky et al. ((1995), Neuroscience Letters 201, 29-32) untersuchen die Wirkung des Proteasominhibitors Calpain Inhibitor 1 auf die Sekretion von β -Amyloid-Peptid, das durch Spaltung des β -Amyloid-Precursor-Proteins (APP) entsteht, und das als ein Auslöser der Alzheimer Krankheit diskutiert wird. Proteasom-Strukturdaten sind in dieser Publikation nicht enthalten.

10

Fenteany et al. ((1995), Science, Vol. 268, 726-731) beschreiben den Streptomyces Metaboliten Lactacystin als Zellzyklusinhibitor und Induktor für Neuritenauswachsen einer Maus Neuroblastomazelllinie. Als spezifisches zelluläres Ziel dieses Inhibitors wurde das 20S Proteasom mittels Tritium-markiertem Lactacystin identifiziert. Eine kristallisierbare Proteasomen-Präparation wird nicht beschrieben.

WO 91/13904 beschreibt die Identifizierung und Charakterisierung einer Chymotrypsin-ähnlichen Protease, die als multikatalytische Protease vorliegt sowie deren Verwendung zur Behandlung der Alzheimer Krankheit. Die Verwendung von für Chymotrypsin-Aktivität-spezifischen Substraten zum Testen oder Screening von Inhibitoren wie hierin beschrieben, führt ausschließlich zur Identifizierung von Inhibitoren, die spezifisch für eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität sind.

Somit wird ersichtlich, daß ein großes Bedürfnis nach weiteren Erkenntnissen über Proteasomen, insbesondere hinsichtlich deren genauen Struktur besteht, um die Herstellung von neuen Proteasomeninhibitoren auf rationale Weise zu ermöglichen. Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, ein Verfahren bereitzustellen, das die Kristallisierung eukaryontischer Proteasomenpräparationen ermöglicht, so daß mit Hilfe der Kristallstruktur die Entwicklung neuer Inhibitoren vereinfacht wird.

- 5 -

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum Gewinnen einer aufgereinigten eukaryontischen Proteasomenpräparation, umfassend die Schritte:

- 5 (a) Herstellung eines Rohextrakts durch Aufschluß von eukaryontischen Zellen,
- (b) Abtrennung unlöslicher Bestandteile aus dem Rohextrakt,
- (c) chromatographische Auftrennung in Fraktionen über ein Ionenaustauschermedium, z. B. Q- Sepharose,
- 10 (d) Testen der in Schritt (c) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen,
- (e) chromatographische Auftrennung über Hydroxyapatit,
- (f) Testen der in Schritt (e) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen,
- 15 (g) Konzentrierung der vereinigten Fraktionen,
- (h) chromatographische Auftrennung über ein Gelfiltrationsmedium in einem Molekulargewichtsbereich von 5 kD bis 5 MD, z. B. Superose und
- 20 (i) Testen der in Schritt (h) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen.

Als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren können beliebige eukaryontische Zellen eingesetzt werden, z. B. Tierzellen, Pflanzenzellen oder Pilzzellen wie etwa Hefezellen. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Hefezellen, z. B. *Saccharomyces cerevisiae*.

Das Testen der Fraktionen während des Anreicherungsprozesses erfolgt üblicherweise durch Bestimmung der für Proteasomen typischen proteolytischen Aktivität. Als Substrate können hierbei beispielsweise bekannte chromogene Peptide eingesetzt werden. Vorzugsweise erfolgt das Testen der Fraktionen derart, daß man jeweils zwei parallele Bestimmungen der proteolytischen Aktivität durchführt, wobei die eine in Abwesenheit und 35 die andere in Gegenwart eines Proteasomeninhibitors, z. B. Lactacystin, durchgeführt wird. Diese Art des Testens erlaubt eine eindeutige Unterscheidung der Proteasomen enthaltenden

- 6 -

Fraktionen von anderen Fraktionen mit proteolytischer Aktivität.

Die Durchführung der Anreicherung umfaßt drei chromatographische Trennschritte (c), (e) und (h), von denen mindestens einer in einem FPLC-System durchgeführt werden kann, z. B. Schritt (h).

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird eine aufgereinigte Proteasomen-Präparation erhalten, die in einer ausreichenden Menge und Reinheit vorliegt, so daß eine nachfolgende Kristallisierung ermöglicht wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine aufgereinigte eukaryontische Proteasomenpräparation, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich ist. Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine aufgereinigte eukaryontische Proteasomen-Präparation in kristallisierbarer Form. Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine aufgereinigte kristallisierte eukaryontische Proteasomen-Präparation.

Die kristallisierte Proteasomen-Präparation kann auch einen Proteasomen-Inhibitor enthalten. Beispiele für geeignete bekannt Proteasomen-Inhibitoren sind Lactacystin oder Analoga davon bzw. Tripeptid-Aldehyde wie Calpaininhibitor.

Die erfindungsgemäße eukaryontische Proteasomen-Präparation umfaßt ein 20S Proteasom, d. h. einen Komplex aus 28 Untereinheiten, der jeweils 2 Moleküle von sieben verschiedenen α -Typ-Untereinheiten und sieben verschiedenen β -Typ-Untereinheiten enthält. Darüber hinaus kann der Komplex noch Metallionen, z. B. Magnesium, Lösungsmittelmoleküle, z. B. Wasser, und andere Polypeptidkomponenten enthalten.

Die erfindungsgemäße aufgereinigte eukaryontische Proteasomenpräparation kann zur Identifizierung und Gewinnung neuer Pro-



- 7 -

teasomen-Inhibitoren eingesetzt werden. Dabei werden insbesondere Daten aus der Kristallstruktur von kristallisierten eukaryontischen Proteasomen-Präparationen eingesetzt. Die Identifizierung und Gewinnung neuer Proteasomen-Inhibitoren erfolgt vorzugsweise in einem computergestützten Modellprogramm.

Beispielsweise kann das Inhibitor-Design durch visuelle Inspektion graphischer Darstellungen der Struktur erfolgen und zwar insbesondere

- 10 (a) durch Bestimmung der für Liganden zugänglichen Volumina an aktiven Stellen, z. B. mit Hilfe der Programme INSIGHT, SYBYL, QUANTA, FRODO, O etc.,
- 15 (b) durch Bestimmung von idealen Ligandeneigenschaften hinsichtlich Hydrophobizität oder Wasserstoffbrückenbindungen, z. B. mit Hilfe der Programme LUDI, GRID etc. oder/und
- (c) durch Bestimmung der elektronischen Eigenschaften von für
20 Liganden zugänglichen Oberflächen an den aktiven Stellen, z. B. mit Hilfe des Programms GRASP etc.

Alternativ oder zusätzlich können Liganden durch automatisierte Ligandenfragment-Andock- oder Anpassprozeduren, z. B.
25 mit Hilfe der Programme DOCK, LUDI, LEAPFROG etc. ermittelt werden.

Besonders bevorzugt werden für diesen Zweck die Kristalldaten der Proteasomuntereinheiten vom β -Typ, insbesondere der Proteasom-Untereinheiten $\beta 5$ /PRE2, $\beta 1$ /PRE3 oder/und $\beta 2$ /PUP1 bzw. homologer Untereinheiten aus anderen eukaryontischen Proteasomen sowie benachbarte Untereinheiten davon, z. B. $\beta 4$ /C11 oder/und $\beta 7$ /PRE4 verwendet.

35 Für das Design von Inhibitoren des humanen Proteasoms können die erfindungsgemäßen Kristallstrukturdaten des Hefeproteasoms mit bekannten Aminosäuresequenzen des humanen Proteasoms durch

Homologiemodelling modifiziert werden. Ein solches Homologiemodelling kann durch molekulare Grafikprogramme wie etwa O, INSIGHT, FRODO, etc. durchgeführt werden. Insbesondere erfaßt die vorliegende Erfindung ein Homologiemodelling der homologen
5 aktiven Stellen der aktiven Monomere im allgemeinen und insbesondere zum Zwecke des Inhibitor-Designs. In Figur 1 ist die Homologie der Aminosäuresequenzen des Hefeproteasoms und des humanen Proteasoms in den relevanten Bereichen gezeigt.

10 Weiterhin soll die Erfindung durch nachfolgenden Beispiele und Figuren erläutert werden. Es zeigen:

Figur 1 die Homologie zwischen den für die aktiven Untereinheiten des Proteasoms kodierenden Aminosäuresequenzen aus Hefe und Mensch; die
15 β 1/PRE3, β 2/PUP1, β 5/PRE2 Subfamilien sind gelb, grün bzw. blau dargestellt; die Reste der S1-Tasche, welche die Spezifitätsänderungen der PRE3 Subfamilie nach Substitution der humanen
20 Untereinheit Y durch LMP2 nach Cytokininduktion beeinflussen, sind braun gezeichnet;

Figur 2 die Topologie der 28 Untereinheiten des 20S Proteasoms, gezeichnet als Kugeln,

25 Figur 3 die C α -Kettenpositionen der Untereinheiten β 7/PRE4, β 6/C5, β 1'/PRE3, β 2'/PUP1 und β 3'/PUP3, in denen die β -cis und β -trans- β -Wechselwirkungen durch Kontakte von Insertionssegmenten hervorgehoben sind,
30

Figur 4a bis b Elektronendichtekarten (Konturiert ab 1 σ) in ähnlichen Orientierungen um THR1 mit zwei F_o-F_c-
35 Coeffizienten nach zweifacher Mittlung; die roten Modellteile wurden über die Phasengebung weggelassen. β 5/PRE2 mit dem kovalent gebundenem Lactacystin (LACT) und dem Wassermolekül

- 9 -

NUK (a) und $\beta 7/\text{Pre}4$ mit einem Teil eines Pro-peptids (b),

Figur 5

ein Schema der vorgeschlagenen chemischen Schritte von Autolyse und Substrathydrolyse. Erzeugung eines Prozessierungsintermediats durch Hydrolyse an der "sauren" β -Ringfläche (A). Erzeugung der vollständig prozessierten aktiven Untereinheit über ein Acyl-Enzym (B) und dessen Hydrolyse (C). Michaelis-Komplex eines Substratpolypeptids (D). Spaltung an der β -Ringfläche und Bildung mit Peptidspaltung assoziierten Acyl-Enzyms (E). Acyl-Enzym-Hydrolyse und Freisetzung des Octapeptidprodukts (F).

Figur 6a bis c die Bindung des Calpaininhibitors und die S1 Taschen, $\beta 1/\text{PRE}3$ ist in Grau mit den P1 kontaktierenden Resten in Rot dargestellt; $\beta 2/\text{PUP}1$ ist in Grün und der Inhibitor in Blau (a) dargestellt; $\beta 2/\text{PUP}1$ (b), $\beta 5/\text{PRE}2$ (c) mit analogen Farbgebungen;

Figur 7

die untere Hälfte der β - β -Kammer. Die Hauptkette mit roten Kreisen für die Carbonylsauerstoffe ist für die C-terminalen Abschnitte der Helices H2 der sieben β -Typ Untereinheiten, die die β -Ringfläche definieren, angegeben. Die intermediär prozessierten und die unprozessierten Propeptide der Untereinheiten $\beta 6/\text{C}5$, $\beta 7/\text{PRE}4$, $\beta 3/\text{PUP}1$ und $\beta 4/\text{C}11$ (grün) und der Calpaininhibitor (gelb) gebunden an $\beta 1/\text{PRE}3$, $\beta 2/\text{PUP}1$ und $\beta 5/\text{PRE}2$ sind gezeigt. Zwei Magnesiumionen, die nahe der β -Ringfläche lokalisiert sind, sind als silberne Kreise gezeichnet; und

- 10 -

Figur 8 eine Oberflächenansicht des Proteasomenmoleküls, geschnitten längs der Zylinderachse. Drei der sechs Calpaininhibitormoleküle, gebunden an β 1/PRE3, β 2/PUP1 und β 5/PRE2 sind als raumfüllende Modelle in rot dargestellt. Die abgedichteten α -Öffnungen an beiden Enden des Partikels, einige wenige schmale Seitenfenster und die scharf abgeschnittenen inneren β -Ringflächen sind zu erkennen.

Beispiele

Beispiel 1 Proteinpräparation und Charakterisierung

Hefezellen von *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe-Mayr, München, Deutschland) wurden zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen und in Puffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM NaN_3) in einem Gewichtsverhältnis Zellen zu Puffer von 2:3 suspendiert. Die Zellen wurden für 10 Min in einer Mühle (Biomatik, Deutschland) mit Glaskugeln (Durchmesser: 0,5 mm; Volumenverhältnis Glaskugeln zu Zellsuspension: 3:2) desintegriert. Das Aufbrechen der Zellen wurde mikroskopisch überwacht.

Nach Filtration wurde der Rohextrakt für 10 min bei 10.000 x g in einer Sorvall RC 2B Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut 45 min bei 134.000 x g in einem Ti-55,2 Rotor (Beckmann) zentrifugiert. Die Lipide aus der obersten Schicht wurden sorgfältig entfernt und die verbleibenden gelben Lösungen vereinigt. Die Proteinkonzentrationen waren etwa 50 mg/ml.

Unmittelbar nach der Zentrifugation wurde der Extrakt auf eine Q-Sepharosesäule (5 x 20 cm) aufgebracht, die mit 280 mM NaCl in Puffer A äquilibriert war. Die Säule wurde mit 280 mM NaCl in Puffer A gewaschen, die Proteine wurden mit einem Gradienten von 280 bis 800 mM NaCl eluiert. Die Durchflußrate war 120 ml/h und es wurden 12 ml Fraktionen gesammelt. Das Protea-

- 11 -

som wurde bei 400 - 450 mM NaCl eluiert. In allen Fraktionen wurden Chymotrypsin-artige (CL), Peptidylglutamyl-Peptid-hydrolase (PGPH) und Trypsin-artige (TL) enzymatische Aktivitäten gemessen.

5

Um das 20S Proteasom zu erhalten, wurde von allen aktiven Fraktionen in Gegenwart von Lactacystin erneut die CL-Aktivität gemessen und die Fraktionen mit verringerten Aktivität wurden gesammelt. Die vereinigten Fraktionen wurden dreifach
10 mit Wasser verdünnt und auf eine Hydroxyapatitsäule (3 x 10 cm) aufgetragen, die mit 60 mM Kaliumphosphat, pH 7,5 äquilibriert war. Die Säule wurde mit 60 mM Kaliumphosphat pH 7,5 gewaschen und mit einem Gradienten von 60-300 mM Kaliumphosphat eluiert wird. Die Durchflußrate war 60 ml/h. Es wurden
15 den 12 ml Fraktionen gesammelt. Die CL-, PGPH- und TL- Aktivität wurde in allen Fraktionen gemessen und die aktiven Fraktionen wurden vereinigt.

Die vereinigten Fraktionen wurden zwanzigfach durch Ultrafiltration unter Verwendung einer AMICON YM30 Membran
20 konzentriert und das Konzentrat wurde auf eine Superose 6 Säule (1 x 30 cm) äquilibriert mit Puffer A aufgetragen. Die Elution wurde mit einer Durchflußrate von 18 ml/h in Puffer A durchgeführt. Das Proteasom eluierte nach 37 min. Aus 500 g
25 Hefezellen konnten auf diese Weise 50 mg kristallisierbares Protein erhalten werden.

Alle präparativen Schritte mit Ausnahme der FPLC wurden bei 4°C ausgeführt. Die chromogenen Peptidsubstrate wurden in
30 Dimethylsulfoxid bei einer Konzentration von 1 mM gelöst. Die proteolytische Aktivität gegen diese Substrate wurde gemäß Achtstetter et al. (1994), J. Biol. Chem. 259, 13344-13348, bestimmt. Die chromogenen Peptidsubstrate wurden von Bachem (Bubendorf, Schweiz) bezogen. Q-Sepharose und Hydroxyapatit
35 stammten von Sigma und BioRad. Die FPLC Vorrichtung, die MonoQ- und Superose 6 Säule stammten von Pharmacia (Freiburg,

- 12 -

Deutschland), alle anderen Chemikalien wurden in der höchst möglichen Reinheit von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Beispiel 2 Kristallisierung

5 Die Kristalle wurden in Hängetropfen bei 24 °C gezüchtet. Die Proteinkonzentration, die zur Kristallisation verwendet wurde, war 40 mg/ml in 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) und 1 mM EDTA. Die Tropfen bestanden aus 4 µl der Proteinlösung und 2 µl einer
10 Reservoirlösung, die 40 mM Magnesiumacetat, 0,1 M Morpholinoethansulfonsäure (pH 6,5) und 12 % 2,4-Methylpentandiol enthielt. Die den Inhibitor Lactacystin enthaltenden Kristalle wurden durch Eintauchen in eine 1 mM Lactacystinlösung für 6 h hergestellt. Die den Inhibitor Acetyl-Leu-Leu-Norleucin (Cal-
15 pain Inhibitor I, Boehringer Mannheim) enthaltenden Kristalle wurden durch Eintauchen in eine 5 mM Calpainlösung für 6 h hergestellt. Die kristallographischen Daten sind in Tabelle 1 angegeben.

20 Beispiel 3 Kristallographie

Die Kristalle waren sehr gut geordnet und zeigten nur eine leichte Anisotropie. Somit wurde eine Auflösung von 0,24 nm möglich. Die Acetyl-Leu-Leu-Norleucin-inhibierten Kristalle
25 hatten eine etwas verringerte Ordnung.

Die Anisotropie der Diffraktion wurde unter Verwendung der gefundenen Strukturfaktoramplituden mit solchen korrigiert, wie sie aus einem Modell mit isotropen Temperaturfaktoren
30 unter Verwendung von XPLOR (Bruenger, 1992) berechnet wurden. Die Datensätze wurden bei der BW6-Beamline am DESY Hamburg mit einer Synchrotronstrahlung von $\lambda = 0,11$ nm erhalten. Die Kristalle wurden in einen Gefrierschutzpuffer (30 % MPD, 28 mM Magnesiumacetat, 0,1 M Morpholinoethansulfonsäure, pH 6,9)
35 eingetaucht und in einem Strom von 90 °K kaltem Stickstoffgas gefroren. Die Diffraktionsdaten wurden mit einer 300 mm Mar Forschungs-Imagingplatte in einer Entfernung von 275 mm (LACT)

oder 280 nm (CAL) gesammelt. Die Bestimmung von Röntgenintensitäten erfolgte mit dem MOSFLM Computerprogramm Version 5.3 und die Datenreduktion wurde mit CCP4 durchgeführt (Leslie (1992), Acta Cryst. D50, 760-763; Joint CCP4 and ESF-EACMB, Newslett. Protein Crystallogr. (Daresburg Laboratory Warrington UK 26; Collaborative Computational Project Number 4 (1994).

Eine bei 0,5 nm Auflösung berechnete Rotationsfunktion zeigte zwei mit der Kristallsymmetrie in Beziehung stehende Peaks, die auf das Vorhandensein von lokalen diadischen Molekülachsen bei ψ 86° ϕ 90° und ψ 94° ϕ 90° hinwiesen. Ihre Korrelationswerte waren die Hälfte des Wertes einer kristallographischen Diade, wie sie für eine fast ideale molekulare zweifache Symmetrie zu erwarten war. Das T.acidophilum Modell wurde für die Patterson Suchkalkulationen unter Verwendung von AMoRe (Navaza (1994), Acta Cryst. A50, 157-163) bei einer Auflösung von 0,35 nm eingesetzt. Diese zeigten, wenn man die D7 Symmetrie des Untersuchungsmodells in Betracht zog, eine einzige Lösung mit einem Korrelationswert von 0,32 und einem R-Faktor von 56 % verglichen mit dem nächsthöchsten Peak von 0,28 und 57 %.

Das T.acidophilum Modell wurde auf Polyalanin reduziert mit nur einigen wenigen konservierten Resten, die in der α -Typ Untereinheit verblieben. Dieses Modell ergab einen R-Faktor von 57,7 % und wurde zur Berechnung einer $2F_o - F_c$ Karte bei 0,24 nm mit X-PLOR (Bruenger (1992), X-PLOR Version 3.1. A System for X-Ray Crystallography and NMR) verwendet. Die elektronische Dichte wurde im Realraum mit MAIN (Turk (1992), Dissertation, Technische Universität München) unter Verwendung der lokalen Zweifachachse im gegenwärtigen Modell ($\psi=85,1$, $\phi=90,8$, $\kappa=180,1$) gemittelt, rücktransformiert, und eine neue Dichte wurde mit $2F_o - F_c$ Koeffizienten berechnet. Nach 10 Abgleichungszyklen war die Qualität der Karte gut ($R_{\text{back}}=27,3$ %). Die einzelnen Untereinheiten wurden entsprechend ihrer charakteristischen Insertionen, Deletionen und Aminosäuresequenzen identifiziert und wurden in die Karte auf einer ESV-30 Graphiksystem

- 14 -

Arbeitsstation (Evans & Sutherland, Salt Lake City, Utah) unter Verwendung von FRODO (Jones (1978), J. Appl. Cryst. 11, 268-272) eingebaut. Eine kristallographische Verfeinerung erfolgte mit X-PLOR (Bruenger, 1992) mit energetisch und zweifach nicht-kristallographischen Symmetriebeschränkungen unter Verwendung der von Engh und Huber (1991), Acta Cryst. A 47, 392 - 400, beschriebenen Parameter. Zusätzlich wurde zur Korrektur für eine anisotrope Kristallordnung ein Streuungsbeitrag für das Lösungsmittel berechnet und während der Verfeinerung in die Berechnung des Modells einbezogen.

Das fertige Modell berücksichtigte die Inhibitormoleküle Lactacystin und Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal, 18 Magnesiumionen, bzw. 1.800 Wassermoleküle. Die R-Werte sind zufriedenstellend und die Standardgeometrie der Bindungen und Winkel hervorragend. Die lokale molekulare diadische Symmetrie ist gut konserviert, was auch durch den sehr geringen Wert R_{back} 13 % in der Endstufe der Analyse gezeigt wird. Der Anstieg im R-Wert um 3 % für Daten mit einer Auflösung von 0,28 nm gegenüber 0,24 nm ist eine Folge der anisotropen Kristallordnung, welche die Datenqualität beeinträchtigt, und der beschränkten Einbeziehung geordneter Lösungsmittelmoleküle.

Beispiel 4 Charakterisierung der Struktur

4.1 Struktur von Untereinheiten

Die 14 aus Hefe klonierten Gene, die für Komponenten des 20S Proteasoms kodieren, können in sieben α -Typ und sieben β -Typ-Untereinheiten eingeteilt werden.

Die β -Typ Untereinheiten werden als Prekursoren synthetisiert, die zu den im assemblierten Proteasom vorliegenden reifen Formen prozessiert werden. Die reifen β -Typ Polypeptide $\beta 2/\text{PUP1}$, $\beta 5/\text{PRE2}$ und $\beta 1/\text{PRE3}$ werden aus ihren Proformen durch Spaltung zwischen Gly-1 und Thr1 unter Freisetzung der aktiven Stelle Thr1 erhalten, während $\beta 7/\text{PRE4}$ zwischen Asn-9 und Thr-8 und $\beta 6/\text{C5}$ zwischen His-10 und Gln-9 gespalten werden und als sta-

- 15 -

bile Prozessierungsintermediate vorliegen. $\beta 4/C11$ und $\beta 3/PUP3$ werden nicht prozessiert und beginnen mit Met(-1) bzw. Met(-9). Die Untereinheiten PUP1, PRE2 und PRE3 werden als vollständig prozessiert, die Untereinheiten PRE4 und C5 als teilweise prozessiert und die Untereinheiten C11 und PUP3 als unprozessiert bezeichnet.

Alle 14 Untereinheiten liegen in der kristallinen molekularen Struktur an eindeutigen Positionen vor. Sie sind fast vollständig definiert durch die Elektronendichte abgesehen von einigen Kettentermini und langen Insertionssegmenten.

Die Elektronendichte für die Hauptketten ist in den α -Typ-Untereinheiten wie folgt definiert: $\alpha 2/Y7$: Thr5-Leu236, $\alpha 3/Y13$: Gly4-Gly237, $\alpha 4/PRE6$: Tyr8- Gln244, $\alpha 5/PUP2$: Arg10- Glu243 (7 Reste der Insertion sind nicht definiert - Gly12 bis Arg 126), $\alpha 6/PRE5$: Phe4 - Ile233, $\alpha 7/C1$: Gly5 - Asn241, $\alpha 1/C7$: Gly6 - Asp240.

In den β -Typ-Untereinheiten ist die Elektronendichte wie folgt definiert: $\beta 3/PUP3$: Ser-8-Asp 193, $\beta 6/C5$: Gln-9-Asp 193, $\beta 4/C11$: Met-1-Gln192, $\beta 7/PRE4$: Thr-8-Ile211, $\beta 2/PUP1$: Thr1-Cys221, $\beta 1/PRE3$: Thr1-Leu196, $\beta 5/PRE2$: Thr1-Gly211.

Alle sieben α - und β -Typ-Polypeptide haben eine charakteristische β -Sandwich-Struktur. Sie ist gebildet aus zwei fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblattstrukturen mit den darüberliegenden helicalen Schichten aus den Helices H3, H4, H5 und den darunterliegenden Helices H1 und H2 gebildet ist. Sie unterscheiden sich aber in den Knicken, die um eine oder zwei Aminosäurereste in der Länge variieren, in langen Insertionen, die Sekundärstrukturelemente verbinden, sowie in den N-terminalen und insbesondere in den C-terminalen Regionen.

Bei den α -Typ-Untereinheiten hat $\alpha 2/Y7$ eine lange Insertionsschleife zwischen den Strängen S9 und S10, die aus einer kurzen α -Helix und einem β -Strang aufgebaut ist. $\alpha 1/C7$ weist eine

- 16 -

Verlängerung der Helix H3 um zwei Knicke durch die Insertion bei G180 auf. Die Untereinheiten $\alpha 1/C7$, $\alpha 3/Y13$, $\alpha 4/PRE6$, $\alpha 5/PUP2$ und $\alpha 7/C1$ haben längere C-terminale Helices H5, die aus der Teilchenoberfläche in die Lösung hervorstehen. Die hoch geladenen, meist sauren C-terminalen Segmente sind unstrukturiert.

Bei den β -Typ-Untereinheiten mit langen Insertionen hat $\beta 7/PRE4$ einen deutlichen Knick zwischen den Helices H1 und H2 und eine zusätzliche α -Helix mit 2 Knicken bei Rest 145. $\beta 6/C5$ hat eine Insertion von 17 Resten zwischen H3 und H4 mit einer komplexen Faltung und einer kurzen Helix. $\beta 2/PUP1$ hat eine sehr lange C-terminale Extension, die in ihren letzten 11 Resten stark ungeordnet ist. Die Untereinheiten $\beta 3/PUP3$ und $\beta 6/C5$ haben kurze C-Termini, so daß die Helices H5 nicht existieren, und die Stränge S10 verlängert sind, um das β -Faltblatt zu vergrößern. In $\beta 4/C11$ existiert die Helix H5, ist aber um 2 Knicke kürzer als bei *T.acidophilum*.

Viele dieser Untereinheit-spezifischen Knicke, Insertionen und N- und C-Termini sind an Kontakten zwischen Untereinheiten beteiligt, wie im folgenden diskutiert wird.

4.2 Der (C7, Y7, Y13, PRE6, PUP2, PRE5, C1; PRE3, PUP1, PUP3, C11, PRE2, C5, PRE4) Komplex

Jede der sieben α -Typ-Untereinheiten hat zwei Nachbarn innerhalb des heptameren Rings, die α -cis-Wechselwirkungen aufweisen, und eine oder zwei in Nachbarschaft liegende β -Typ-Untereinheiten im anderen Ring mit α -trans- β -Wechselwirkungen. Die zentral lokalisierten β -Typ-Untereinheiten haben zusätzlich zu den β -cis und β -trans- α -Wechselwirkungen eine oder zwei in Nachbarschaft liegende β -Typ Untereinheiten im anderen β -Ring mit β -trans- β -Wechselwirkungen.

Die generelle Architektur der Quartärstruktur ist im Proteasom von *T.acidophilum* und Hefe gleich (Fig. 2): Das N-terminale

- 17 -

Schleifensegment, Helix H0 (Reste 20 bis 30), Schleife L, die H2 und S5 verbindende Schleife und der Strang S7 vermitteln α -cis-Wechselwirkungen. Die β -cis-Kontakte, die weniger eng zu sein scheinen, umfassen die Schleife L, das N-Ende der Helix H1, den Strang S7 und den den Strang S8 und die Helix H3 verbindenden Knick. Diese Kontakte stammen aus dem D7-symmetrischen Vorläufer und finden sich auch im *T.acidophilum* Proteasom. Trotz der konservierten Architektur sind diese Kontakte aufgrund ihrer spezifischen Aminosäuresequenzen für die jeweiligen Untereinheiten spezifisch.

Es gibt viele zusätzliche Kontakte, die in *T.acidophilum* fehlen, und durch Sequenzen und Sequenzinsertionen bewirkt werden, die für Hefe und Eukaryonten im allgemeinen charakteristisch sind. Innerhalb der α -Ringe werden enge α -cis-Kontakte durch die verschlungenen N-Termini der Untereinheiten $\alpha 1/C7$, $\alpha 2/Y7$, $\alpha 3/Y13$ und $\alpha 7/C1$ im Zentrum des heptameren Rings hergestellt. Das in allen Untereinheiten konservierte Tyr8 spielt eine zentrale Rolle. Innerhalb der β -Ringe existiert ein sehr spezifischer Kontakt zwischen $\beta 2/PUP1$ und $\beta 3/PUP3$, der durch den langen C-terminalen Arm von PUP1 vermittelt wird, der PUP3 umfaßt und fast den übernächsten Nachbarn $\beta 4/C11$ berührt. β -trans- α -Kontakte erfolgen durch die Helix H1-Schleife-Helix H2 Motive, welche mit den gleichen Motiven von zwei benachbarten α -Untereinheiten wechselwirken. Dieses grundlegende Kontaktmotiv war auch in der *T.acidophilum* Struktur zu sehen (siehe Figur 4a bei Löwe et al. (1995), Science 268, 3479-3486), aber die Insertion bei Rest 66 von $\beta 7/PRE4$ begünstigt dessen Assoziierung mit $\alpha 6/PRE5$ und $\alpha 7/C1$. In ähnlicher Weise bindet die lange Insertion in $\alpha 2/Y7$ bei Rest 210 zwischen den Strängen S9 und S10 an $\beta 2/PUP1$ und koppelt dieses Paar. Spezifische β -trans- β -Wechselwirkungen werden durch den C-terminalen Arm von $\beta 7/PRE4$ gebildet, der zwischen $\beta 2'/PUP1$ und $\beta 1'/PRE3$ eingelagert ist. Das C-terminale Segment von $\beta 5/PRE2$ wechselwirkt mit $\beta 3'/PUP3$ und $\beta 4'/C11$ auf ähnliche Weise (Figur 3). Die lange Insertion von $\beta 6/C5$ am Rest 145 kontaktiert Untereinheit $\beta 3'/PUP3$ und den C-terminalen Arm von $\beta 2'/PUP1$.

- 18 -

Sehr spezifische β -trans- β -Wechselwirkungen werden durch Magnesiumionen vermittelt: Magnesium Y8 verbrückt das Hauptkettencarboxylat von Asp193 aus $\beta 6/C5$ mit der Schleife 162 bis 167 von $\beta 2'/PUP1$. Auf gleiche Weise verbrückt das Magnesium Y9 die Untereinheit $\beta 3/PUP3$ über Asp193 mit $\beta 5'/PRE3$. Darüber hinaus sind diese Carboxylatgruppen Liganden für andere Magnesiumionen, die in den Schleifen 165 von $\beta 4/PUP3$ (Magnesium W6) bzw. $\beta 6/C5$ (Magnesium W4) lokalisiert sind und die eine Rolle in der Stabilisierung der Untereinheitenstruktur spielen können. Die Aspartatreste sind vollständig verdeckt und ihre Seitenketten an Ladung-Ladung-Wechselwirkungen mit Arg 19 von $\beta 2'/PUP1$ bzw. Arg 19 von $\beta 5'/PRE2$ beteiligt, wodurch die β -trans- β -Kontakte weiter verstärkt werden. Die β -Typ Untereinheiten $\beta 1/PRE3$ und $\beta 4/C11$ liegen an der einzigen Moleküldiade des Hefeproteasoms und sind sehr ähnlich dem dominanten β -trans- β -Kontakt an den Resten 133-137 der Helix H3 von *T. acidophilum*.

18 Magnesiumpositionen wurden im Proteasommolekül identifiziert, von denen 12 auf den Innenwänden der β - β -Kammer lokalisiert sind und die im Folgenden diskutierte saure Natur dieses Kompartments belegen. Es ist erkennbar, daß die Vielzahl spezifischer Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten deren spezifische und eindeutige Positionen innerhalb des Proteasoms bestimmt.

4.3 Die N-terminale Threoninposition

Im *T. acidophilum* Proteasom wurde durch Struktur- und Mutationsuntersuchungen ein katalytisches System mit Thr1, Glu17 und Lys33 definiert (Löwe et al. (1995), supra und Seemüller et al. (1995), Science 268, 579-582).

Nahe an Thr 1 befinden sich die Reste Ser129, Ser169 und Asp166, die für die strukturelle Integrität dieser Stelle erforderlich sind, aber auch an der Katalyse beteiligt sein könnten. Durch Mutagenese wurde gezeigt, daß Asp166 im Protea-

- 19 -

som von *T. acidophilum* essentiell ist (Seemüller et al. (1996), Nature 382, 468-470). Diese Reste sind in den aktiven Untereinheiten PUP1, PRE2 und PRE3 invariant.

5 Zusätzlich wurde ein vollständig gebundenes Lösungsmittelmolekül NUK in allen drei Untereinheiten nahe bei Thr10^γ und N, Ser1290^γ und N und Gly47N gefunden, wie exemplarisch für die Untereinheit β5/PRE2 im Lactacystin-Komplex (Figur 4) gezeigt ist. Dies wurde bei einer geringeren Auflösung im Modell von
10 *T. acidophilum* nicht erkannt. Thr1N hat Wasserstoffbrücken zu Ser1680 und O^γ und Ser1290^γ. Thr10^γ hat eine Wasserstoffbrücke zu Lys33^δ. Asp17 hat Wasserstoffbrücken über O^{δ1} zu Arg19N und Gly170N und über O^{δ2} zu Thr/Ser2N und Lys33N^δ. Auf ähnliche Weise hat Lys33N^δ drei Wasserstoffbrücken zu Asp170^{δ2}, Arg190
15 und Thr10^γ.

Das Muster von Wasserstoffbrücken läßt vermuten, daß sowohl Asp17 als auch Lys33 geladen sind. Thr1N kann eine Wasserstoffbrücke zu ThrO^γ ausbilden und ist vermutlich neutral, ein
20 Zustand der durch einen nahegelegenen positiv geladenen Lysinrest begünstigt wird. Eine solche Ladungsverteilung wäre auch aufgrund der jeweiligen Standard-pKa-Werte zu erwarten. Thr1N ist daher höchswahrscheinlich der Protonenakzeptor, wenn Thr10^γ an einem elektrophilem Zentrum beteiligt ist. Dies wird durch
25 die Struktur des Lactacystinkomplexes bestätigt, der einen Ester zwischen Lactacystin und Thr1 als Ergebnis einer β-Lacton-Ringöffnung nach einem nukleophilen Angriff durch Thr10^γ aufweist. Thr1N ist genau an der Position, um als Protonenhutle von Thr10^γ zum Lactacystin-O6' zu dienen. Eine analoge
30 Reaktionssequenz wird für die Hydrolyse des C-terminalen Fluorophoren von fluorogenen Substraten vorgeschlagen, wobei der Protonentransfer im Amidstickstoff der Abgangsgruppe erfolgt. Das erzeugte Acyl-Enzym wird, wie in den Abschnitten D-E von Figur 5 gezeigt, durch das Wasser NUK deacyliert. Alternativ
35 oder parallel könnte ein direkter Angriff von NUK auf die Peptidbindung erfolgen, wobei das Intermediat I umgangen wird.

4.4 Inhibitorbindung

β 3/PUP1, β 1/PRE3 und β 5/PRE2 haben den Inhibitor Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal kovalent an Thr10' vermutlich als Hemiacetal gebunden. Er nimmt eine β -Konformation an und füllt die Lücke zwischen Strängen, welche die Reste 20 und 21 bzw. 47 enthalten (der Schleife L in Figur 3 bei Löwe et al., 1995, supra, zugeordnet), an die er über Wasserstoffbrücken gebunden ist, wodurch eine antiparallele β -Faltblattstruktur erzeugt wird.

Die Norleucinseitenkette reicht in eine Tasche (die S1 Tasche) hinein, die seitlich zu einem Tunnel hin offen ist, der zur Partikeloberfläche führt. Die Leucinseitenkette bei P2 ist nicht in Kontakt mit Protein und die Leucinseitenkette bei P3 ist in Kontakt mit der benachbarten β -Untereinheit. Die S1-Spezifitätstasche wird hauptsächlich durch die Reste 20, 31, 35, 49, 53 gebildet, d. h. Ala20, Val31, Ile35, Met45, Ala49, Gln53(K) in β 5/PRE2 (Fig. 6c), Thr20, Thr31, Thr35, Arg45, Ala49, Gln53 in β 1/PRE3 (Fig. 6a), Ser20, Cys31, His35, Gly45, Ala49, Glu53 in β 2/PUP1 (Fig. 6b). Der Rest 45 formt den Boden der Tasche und scheint weitgehend ihren Charakter zu bestimmen. Benachbarte Untereinheiten in den β -Ringern tragen weiter zu den S1-Taschen bei und modulieren deren Charakter: β 2/PUP1 im Falle von β 1/PRE3 mit His114, His116, Ser118, Asp120; β 3/PUP3 im Falle von β 2/PUP1 mit den Resten Asp114, Asp120 und Cys118 und β 6/C5 im Falle von β 5/PRE2 mit Ser118, Asp114, Glu120 und Glu122.

Lactacystin ist kovalent an β 5/PRE2 gebunden. Dies steht im Einklang mit der beobachteten chemischen Modifizierung von Untereinheit X des Säugerproteasoms (Fenteany et al., (1995), Science 268, 726-730) dem Homolog von PRE2. Seine Dimethylseitenkette bei C10 reicht wie eine Valin- oder Leucinseitenkette in S1 hinein, aber weniger tief als die Norleucinseitenkette von Calpain. Lactacystin bildet mehrere Wasserstoffbrücken mit Atomen der Proteinhauptkette LactN-Gly47O, LactO4'-Gly47N, LactO9'-Thr21N, LactO6'-Thr1N. Da diese zuletzt genannten Wechselwirkungen auch in β 2/PUP1 und β 1/PRE3 auftreten könn-

ten, die keine kovalenten Komplexe mit Lactacystin bilden, scheint die S1 Seitengruppe, die in der hydrophoben S1 Tasche von $\beta 5$ /PRE2 bindet, die Ausbildung einer kovalenten Bindung und deren Stabilisierung zu dirigieren. somit ist diese Seitengruppe ein wichtiger Ansatzpunkt zur Entwicklung von Inhibitoren.

4.5. Spezifität

10 $\beta 5$ /PRE2 hat einen Methioninrest an Position 45 in Kontakt mit der verzweigten Seitenkette von Lactacystin im Komplex. Im Calpain-Inhibitor-Komplex drückt die Norleucinseitenkette von Calpain die Methioninseitenkette um bis 0,27 nm in Richtung auf Ile35, das aus dem Weg rotiert. Diese koordinierten Bewegungen machen die S1 Tasche geräumiger. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, daß Lactacystin die chymotryptische Aktivität gegenüber chromogenen Substraten hemmt. Auf ähnliche Weise wird die chymotryptische Aktivität in Proteasomen mit einer $\beta 5$ /PRE2 Mutante, die nicht aus ihrer Proform prozessiert werden kann (Chen & Hochstrasser (1996), Cell 86 961-972) und durch eine Mutation in $\beta 5$ /PRE2 verringert, wo eine Substitution von Ala49 durch Val in der S1 Tasche die Größe beschränkt (Heinemeyer et al. (1993), J. Biol. Chem. 268, 5115-5120). $\beta 1$ /PRE3 hat einen Argininrest in Position 45 am Boden der S1 Tasche, die gut für Glutamat P1 Reste geeignet ist. Sie ist am wahrscheinlichsten die mit der Peptidylglutamyl-Peptid-Hydrolyseaktivität (PGPH) des Proteasoms assoziierte Untereinheit. Jedoch auch die Norleucinseitenkette besetzt diese basische Tasche im Calpaininhibitor-Komplex. Es wurde eine hoher zusätzlicher Dichtepeak beobachtet, der mit der Guanidiniumseitenkette assoziiert ist und als Chlorid- oder Carbonation interpretiert werden kann, welches eine nicht ausgeglichene positive Ladung kompensiert. $\beta 2$ /PUP1 hat als Rest 45 ein Glycin und folglich eine geräumige, am Boden durch His35 und Glu53 begrenzte S1 Tasche.

- 22 -

Wir folgern, daß $\beta 5$ /PRE2 sowohl die chymotryptische als auch die tryptische Aktivität enthält, während $\beta 1$ /PRE3 die PGPH-Aktivität enthält, aber beide Taschen sind hinsichtlich der Größe (PRE2) und der Polarität (PRE3) anpassungsfähig. $\beta 2$ /PUP1 ist für sehr große P1 Reste mit basischem Charakter geeignet. Mutationsanalysen haben gezeigt, daß Substitutionen in $\beta 4$ /C11 und $\beta 7$ /PRE4 die chymotrypsinartige bzw. die PGPH Aktivität beeinflussen (Heinemeyer et al. (1993), supra; Hilt & Wolf (1996), TIBS 21, 96-102; Hilt et al. (1993), J. Biol. Chem. 268, 3479-3486). Diese Untereinheiten sind inaktiv, aber in Nachbarschaft zu den Untereinheiten $\beta 5$ /PRE2 und $\beta 1$ /PRE3 aus beiden Ringen gelegten (Figur 4). Der Austausch von Ser136 durch das voluminöse Phe in $\beta 4$ /C11 stört den β -trans- β -Kontakt an Helix H3 zwischen $\beta 4$ /C11 und $\beta 5$ /PRE2 und kann die benachbarte Thr1 Stelle stören, wie auch vermutlich die Deletion der 15 C-terminalen Reste von $\beta 7$ /PRE4, die extensive Kontakte mit $\beta 1$ /PRE3 bilden (Fig. 3).

4.6 Propeptide und Prozessierung

Fünf β -Typ-Untereinheiten werden mit Propeptiden unterschiedlicher Längen bis zu 75 Aminosäuren synthetisiert, die während der Reifung abgespalten werden. $\beta 2$ /PUP1, $\beta 5$ /PRE2 und $\beta 1$ /PRE3 zeigen eine Autolyse zwischen Gly-1 - Thr1. Dies ist ein Prozeß, für den das Vorhandensein von Thr1, Gly-1 und Lys33 erforderlich ist. Wir hatten bereits eine Autolyse innerhalb der Untereinheit vorgeschlagen, wobei Thr1O⁻ als Nukleophil die vorangehende Peptidbindung angreift (Schmidtke et al. (1996), EMBOJ. 15, 6887-6898).

Gemäß der Kristallstruktur wird dem Wasser NUK eine zentrale Rolle zugeordnet. Es ist idealerweise so positioniert, um als Base bei der Entfernung eines Protons von Thr1O⁻ zu wirken und die nukleophile Addition an den Carbonylkohlenstoff von Gly-1 anzutreiben. Es gibt keine Informationen über die Position und Orientierung der Gly-1-Thr1-Peptidgruppe in den vollständig prozessierten Untereinheiten, aber wir können sie von teil-

- 23 -

weise prozessierten oder unprozessierten Untereinheiten $\beta 3/\text{PUP}3$, $\beta 6/\text{C}5$ und $\beta 7/\text{PRE}4$ ableiten, welche ähnliche Orientierungen zeigen. Gly-10 ist in diesen Untereinheiten in Richtung des positiv geladenen Lys33N⁺ und von Gly47N gerichtet, die ein Sauerstoffanionenloch in Analogie zu Serinproteasen bilden, um die entstehende negative Ladung zu verteilen, wenn das tetraedrische Addukt gebildet wird. Eine Umlagerung zum Ester kann nach dem Protonentransfer vom Wasser NUK zu Thr1N und Spaltung der Peptidbindung erfolgen. Die nahegelegenen Reste Ser129O^γ und Ser169O^γ unterstützen diese Reaktion. Beide Hydroxylgruppen sind über Wasserstoffbrücken an Asp166 gebunden, welches in den aktiven Untereinheiten invariant ist. NUK ist wahrscheinlich ebenfalls bei der Esterhydrolyse als angreifendes Nukleophil beteiligt, welches schließlich in das Produkt eingebaut wird (Fig. 5, Abschnitte a bis c). Der Gly-1 Rest scheint essentiell zu sein, da eine Seitenkette an Position -1 mit dem Proteinrückgrat bei Position 168 interferieren und eine Konfiguration erzwingen würde, die für eine Autolyse ungeeignet ist.

20

Mit Freisetzung von Thr1 werden die Untereinheiten aktiv. Wenn die katalytische Stelle nicht intakt ist, wie in den Untereinheiten $\beta 3/\text{PUP}3$, $\beta 6/\text{C}5$ und $\beta 4/\text{C}11$, denen Thr1 fehlt, in $\beta 7/\text{PRE}4$, bei dem Lys33 durch Arg ersetzt ist, und in konstruierten Varianten von LMP2, dem Säugerhomolog von $\beta 1/\text{PRE}3$ (Schmidtke et al. (1996), supra) und von PRE2 (Chen & Hochstrasser (1996), supra) tritt eine Autolyse bei Rest 1 nicht auf. $\beta 7/\text{PRE}4$ besitzt beide essentiellen Reste Gly-1 und Thr1, aber in einer Konfiguration, die sich stark von derjenigen unterscheidet, die in den aktiven Untereinheiten gefunden wird, da die Thr1 Seitenkette durch das größere Arg33 weggedrückt wird, welches den Lysinrest ersetzt (Figur 4b). Das Auffinden von Defekten in der katalytischen Aktivität und in der Prozessierung belegt die strukturelle Labilität der Thr1-Stelle, die durch Mutationen von benachbarten Resten der gleichen oder benachbarten Untereinheiten gestört werden kann. Andererseits ist es auch möglich, daß eine inaktive Mutante in

der Umgebung aktiver Untereinheiten selbst aktiv werden kann, was im Einklang mit Beobachtungen steht, daß *T. acidophilum* Spezies, die einen Defekt in der Prozessierung aufweisen, bei Koexpression mit Wild-Typ-Protein prozessiert werden (Seemüller et al. (1996), supra).

Die Propeptide spielen eine essentielle Rolle bei der Assemblierung eukaryontischer Proteasomen, was auf direkte oder indirekte Effekte durch Teilnahme an Wechselwirkungen zwischen Untereinheiten und/oder durch Stabilisierung der Struktur von Untereinheiten zurückzuführen sein kann. Die beobachteten Strukturen der Prozessierungsintermediate von $\beta 7/\text{PRE4(M)}$ und $\beta 6/\text{C5}$ und des unprozessierten Propeptids $\beta 3/\text{PUP3}$ geben Hinweise darauf, daß beide Effekte auftreten, da die Propeptide fest an den Rest des Proteins gebunden sind und mit anderen Untereinheiten wechselwirken, z. B. Propeptid $\beta 7/\text{PRE4}$ mit $\beta 1/\text{PRE3}$ bei den Resten 92 und 115 und Propeptid $\beta 6/\text{C5}$ mit $\beta 7/\text{PRE4}$ bei 91 und 116.

4.7 Eintritt in das und Austritt aus dem Proteasompartikel

Die hydrolytische Aktivität des Proteasoms ist mit Thr1 und der β -Ringflächen im Inneren des die hydrolytische Kammer definierenden β -Hohlraums assoziiert. Das Substrat muß in das Partikel eindringen und das Produkt muß freigesetzt werden. Beim Proteasom von *T. acidophilum* sind zwei Eintrittsöffnungen mit einem Durchmesser von etwa 1,3 nm an den Enden der zylindrischen Teilchen offen, die durch eine Ringfläche von Knickbildenden Segmenten Tyr126-Gly-Gly-Val der sieben identischen α -Untereinheiten begrenzt sind. Die N-terminalen Reste 1 bis 12 sind in diesem Protein ungeordnet.

Im Gegensatz dazu ist die hydrolytische Kammer des 20S Proteasoms der Hefe fast unzugänglich. Die N-Termini der Untereinheiten $\alpha 1/\text{C7}$, $\alpha 2/\text{Y7}$, $\alpha 3/\text{Y13}$, $\alpha 6/\text{PRE5}$ und $\alpha 7/\text{C1}$ reichen in die Öffnung hinein und füllen sie vollständig mit mehreren Schichten von eng miteinander verwobenen Seitenketten aus (Figur 8).

- 25 -

Es gibt somit keinen Zugang in das Innere des Partikels von den Zylinderenden ohne erhebliche Umlagerung. Es gibt einige enge Seitenfenster, insbesondere an der Grenzfläche zwischen den α - und β -Ringern, die durchlässiger sind als im T.acidophilum Proteasom, da kleinere Seitenketten dort vorliegen. Diese Öffnungen befinden sich hauptsächlich zwischen den zahnartigen Helix H1-Knick-Helix H2-Motiven der α - β -Grenzfläche (siehe Figur 4a bei Löwe et al. (1995), supra) und führen zu den N-terminalen Threoninresten des aktiven Zentrums. Sie sind mit polaren und geladenen Aminosäureseitenketten bedeckt, die sich bewegen können, um Öffnungen mit etwa 1 nm Durchmesser zu erzeugen und möglicherweise die Passage von ungefalteten gestreckten Polypeptidketten erlauben. Das 19S Partikel, welches die ATP- und Ubitiquin-Abhängigkeit der Proteolyse durch das Proteasom bewirkt, ist an die Partikel angeheftet um das 26S Proteasom zu bilden. Die Assoziierung führt zu einer starken Aktivierung der Peptidhydrolyse (Hoffman und Rechsteiner (1994), J. Biol. Chem. 269, 1690-16895). Auf ähnliche Weise ist der Proteasomregulator PA28 an α -Typ Untereinheiten gebunden (Kania et al. (1996), Euro. J. Biochem. 236, 510-516). Er beschleunigt die Peptidspaltung und verbessert die Antigenprozessierung. Beide regulatorischen Faktoren könnten die Eingangsöffnungen auf kontrollierte Weise in vivo öffnen.

25 4.8 Erzeugung von MHC Klasse I Peptiden

Das 20S Proteasom erzeugt Peptidprodukte mit einer engen Längenverteilung, überwiegend Octa- oder Nonapeptide, ein Größenbereich, der optimal für die Bindung von MHC Klasse I Molekülen ist (York & Rock (1996), Annu. Rev. Immunol. 14, 369-396). In vitro Untersuchungen haben gezeigt, daß durch 20S Proteasomen aus intakten Proteinen erzeugte Peptide durch MHC Klasse I Moleküle präsentiert werden (Dick et al. (1994) Immunol. 152, 3884-3894; Niedermann et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8572-8577). In einem in vivo Experiment wurde gezeigt, daß Proteasomeninhibitoren die MHC Klasse I Präsentation von Proteinantigenen hemmen (Rock et al. (1994), Cell 78, 761-771)

- 26 -

und daß die Anzahl der an der Zelloberfläche vorliegenden MHC Klasse I Moleküle durch die induzierbaren Proteasomenuntereinheiten $\beta 5i/LMP7$ und $\beta 1i/LMP2$ reguliert wird, wie in Mäusen mit zielgerichteten Deletionen der für diese Proteine codierenden Gene gezeigt wurde (Fehling et al. (1994) Science 265, 1234-1237). LMP2 und LMP7 ersetzen nach IFN- γ Stimulierung die konstitutiv exprimierten Untereinheiten.

MHC Klasse I Peptide haben üblicherweise basische oder hydrophobe C-terminale Reste (siehe den Übersichtsartikel von Engelhard (1994), Curr. Opin. Immunol. 6, 13-23). Die LMP2/7 Substitution ändert vermutlich die Verteilung von Peptiden, so daß ein größerer Anteil der von MHC Klasse I Molekülen bevorzugten Peptiden erzeugt wird. LMP2 ersetzt Y, das humane Homologe von $\beta 1/PRE3$, LMP7 ersetzt X, das Homologe von $\beta 5/PRE2$. Alle Mitglieder dieser Unterfamilie zeigen einen hohen Grad an Sequenzidentität, aber $\beta 1i/LMP2$ hat zwei auffällige Unterschiede gegenüber $\beta 1/PRE3$ in der S1 Tasche: Thr31 \rightarrow Phe und Arg45 \rightarrow Leu. Durch den Austausch von Arg gegen Leu wird die Tasche unpolar und durch den Austausch von Thr gegen Phe enger, so daß die PGPH-Aktivität verringert und die chymotryptische Aktivität erhöht werden sollte, wenn $\beta 1i/LMP2$ das Säugerhomolog für $\beta 1/PRE3$ ersetzt. Dies wird in der Tat beobachtet (Gaczynska et al. (1993), Nature 365, 264-267; Driscoll et al. (1993), Nature 365, 262-264) wenn LMPs durch eine Behandlung mit IFN- γ induziert werden. Die gegenteilige Wirkung findet man in Zelllinien, denen die LMP2 und LMP7 Gene fehlen und in Mutantenmäusen mit einer Disruption des LMP2 Gens (Van Kaer et al. (1994), Immunity 1, 533-541). Ein Ersetzen der Säugerhomologen von $\beta 5/PRE2$ und $\beta 2/PUP1$ durch LMP7 bzw. MECL1 beeinflusst nicht direkt die S1 Taschen und ihre Effekte können nicht von einer Änderung der Spezifität bei P1 stammen, wie man sie für LPM2 findet.

Im Hefe 20S Proteasom werden die Untereinheiten $\beta 7/PRE4$ bzw. $\beta 6/C5$ an den Resten -8 und -9 teilweise prozessiert. Dabei entstehen Octa- oder Nonapeptidprodukte, die nicht aus dem

- 27 -

Enzym freigesetzt werden. Beide Peptide haben ähnliche Konformationen mit einer Verdickung, die zwei Abschnitte mit langgestreckter Konformation unterteilt, was der Konformation von MHC Klasse I-gebundenen Peptiden ähnelt. Durch Vergleich des Propeptids von $\beta 6/C5$ mit einem viralen Peptidnonamer im Komplex mit seinem MHC Klasse I Rezeptor (Madden et al. (1992), Nature 321-325) wird die Ähnlichkeit mit rms Abweichungen für alle Atome von 0,23 nm und für die C^α -Atome von 0,13 nm quantifiziert und läßt vermuten, daß bevorzugte lokale Konformationen eine Rolle bei der Erzeugung (durch das Proteasom) und Präsentation (durch MHC Klasse I Moleküle) von immundominanten Peptidepitopen spielen.

Ansprüche

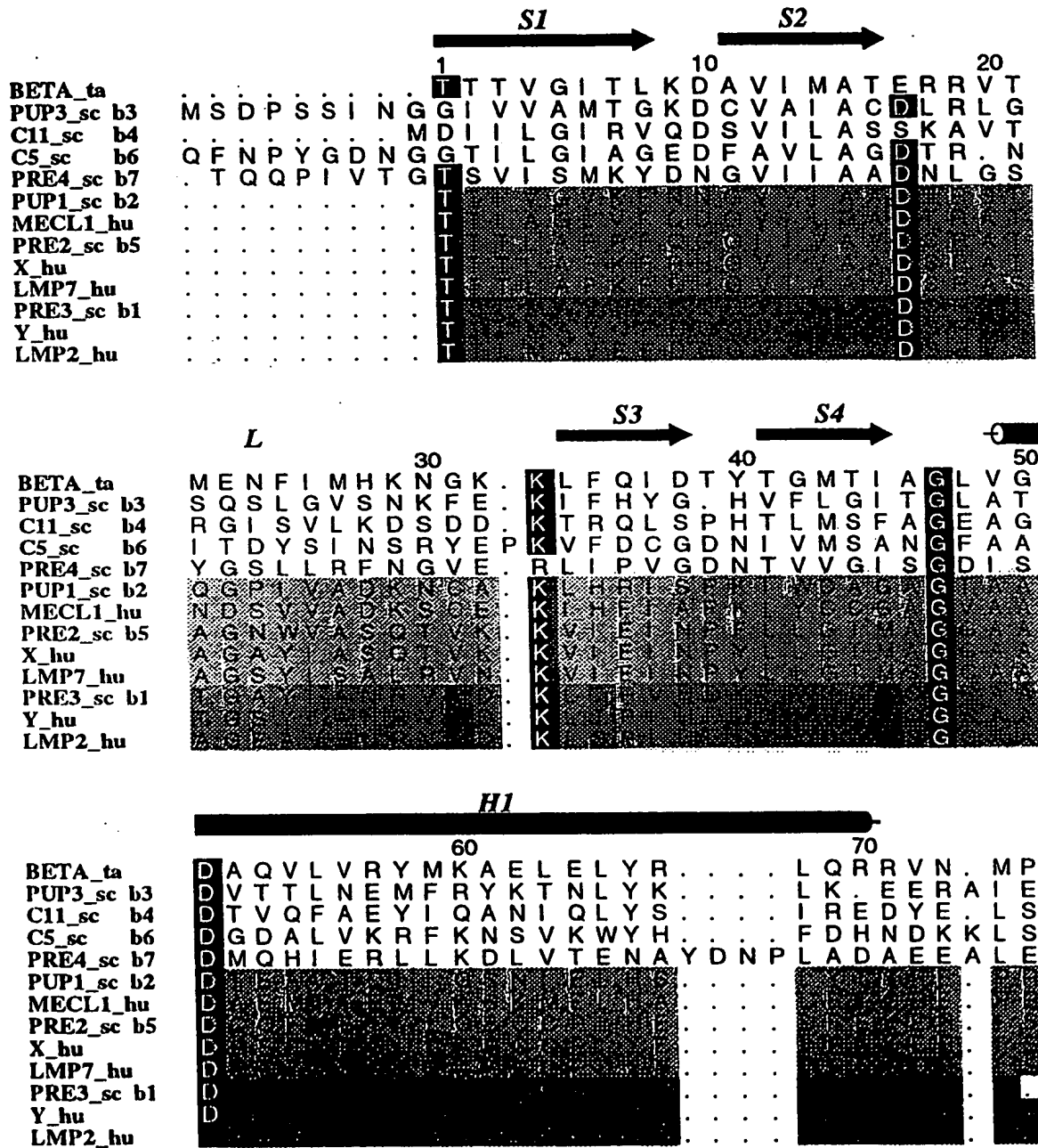
1. Verfahren zum Gewinnen einer aufgereinigten eukaryontischen Proteasomenpräparation, umfassend die Schritte:
 - (a) Herstellung eines Rohextrakts durch Aufschluß von eukaryontischen Zellen,
 - (b) Abtrennung unlöslicher Bestandteile aus dem Rohextrakt,
 - 10 (c) chromatographische Auftrennung in Fraktionen über ein Ionenaustauschermedium,
 - (d) Testen der in Schritt (c) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen,
 - (e) chromatographische Auftrennung über Hydroxyapatit,
 - 15 (f) Testen der in Schritt (e) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen,
 - (g) Konzentrierung der vereinigten Fraktionen,
 - (h) chromatographische Auftrennung über ein Gelfiltrationsmedium und
 - 20 (i) Testen der in Schritt (h) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen.
2. Verfahren nach Anspruch 1
dadurch gekennzeichnet,
25 daß man Hefezellen verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Testen der Fraktionen in Schritt (d), (f)
30 oder/und (i) jeweils zwei Bestimmungen der proteolytischen Aktivität umfaßt, wobei eine in Abwesenheit und die andere in Gegenwart eines Proteasomeninhibitors durchgeführt wird.
- 35 4. Verfahren nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Lactacystin als Proteasomeninhibitor verwendet.

- 29 -

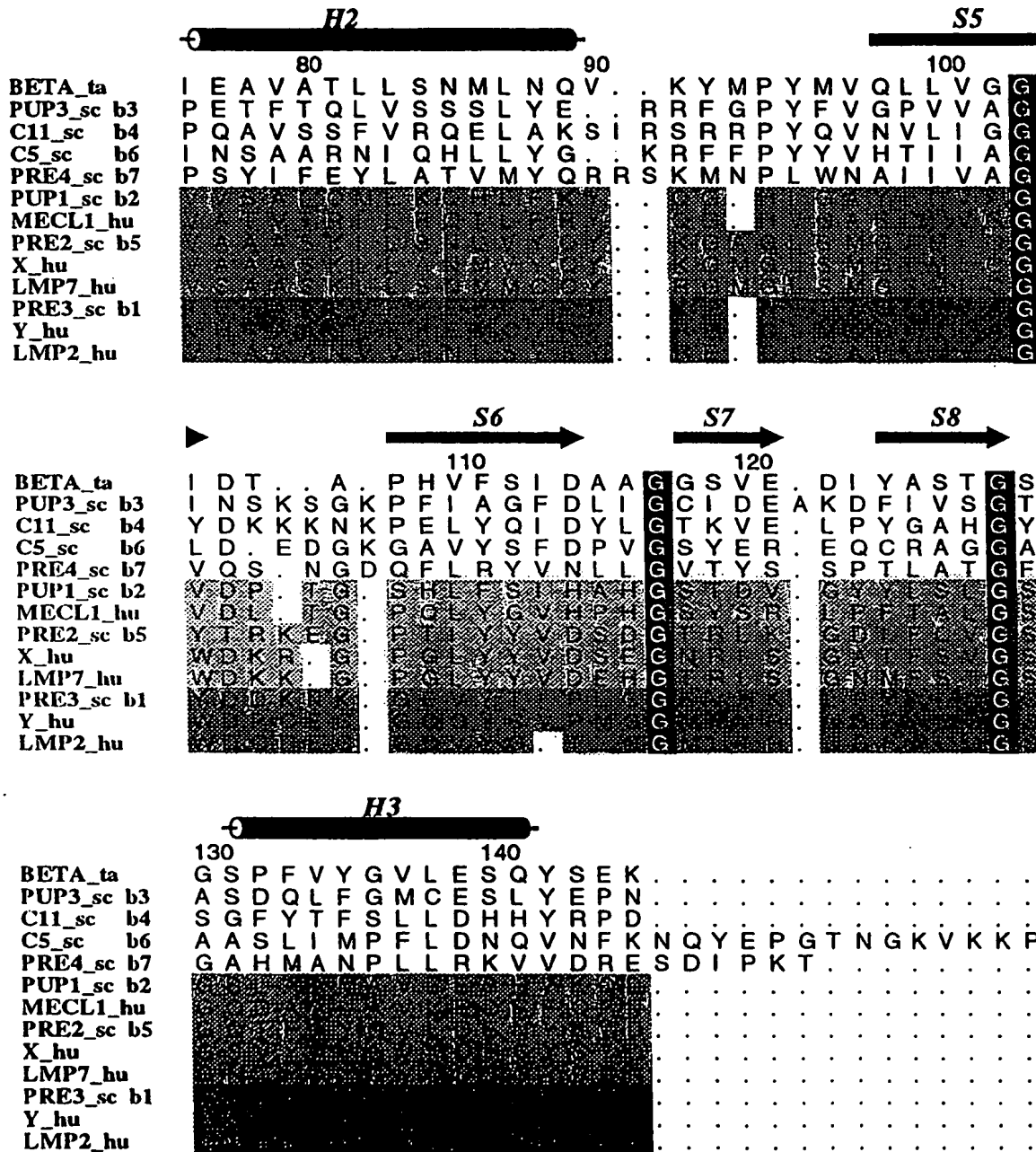
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens einer der chromatographischen
Trennschritte in einem FPLC-System durchgeführt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
weiterhin umfassend das Kristallisieren der aufgereinig-
ten Protesomenpräparation.
7. Aufgereinigte eukaryontische Proteasomenpräparation,
erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1
bis 5.
8. Aufgereinigte eukaryontische Proteasomenpräparation in
kristallisierbarer Form.
9. Aufgereinigte kristallisierte eukaryontische Proteasomen-
präparation.
10. Präparation nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Kristall einen Proteasomeninhibitor enthält.
11. Präparation nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Inhibitor ein Tripeptid-Aldehyd oder Lactacystin
ist.
12. Präparation nach einem der Ansprüche 7 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie ein Proteasom aus einer Hefe umfaßt.
13. Präparation nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie ein Proteasom aus *Saccharomyces cerevisiae* um-
faßt.

14. Präparation nach einem der Ansprüche 7 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen Komplex aus 28 Untereinheiten umfaßt, der
5 jeweils 2 Moleküle von 7 verschiedenen α -Typ-Unterein-
heiten und 7 verschiedenen β -Typ-Untereinheiten enthält.
15. Verwendung der aufgereinigten eukaryontischen Proteaso-
menpräparation nach einem der Ansprüche 7 bis 14 zur
10 Identifizierung und Gewinnung neuer Proteasomeninhibito-
ren.
16. Verwendung von Daten aus der Kristallstruktur von kri-
stallisierten eukaryontischen Proteasomenpräparationen
15 nach einem der Ansprüche 9 bis 14 zur Identifizierung und
Gewinnung neuer Proteasomeninhibitoren.
17. Verwendung von Kristallstrukturdaten aus dem Bereich der
Proteasomentaschen S1 der Untereinheiten β 1/PRE2, β 2/PUP2
20 oder/und β 5/PRE2 zur Identifizierung und Gewinnung neuer
Proteasomeninhibitoren.
18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17 in einem
computergestützten Modellingprogramm.
- 25 19. Verwendung nach Anspruch 18, umfassend einen Schritt des
Homologiemodelling, indem die Kristallstrukturdaten eines
Hefeproteasoms mit Aminosäuresequenzen aus dem humanen
Proteasom modifiziert werden.
- 30 20. Neuer Proteasomeninhibitor,
dadurch gekennzeichnet,
daß er eine zur Proteasomentasche S1 der Untereinheiten
 β 1/PRE3, β 2/PUP2 oder/und β 5/PRE2 komplementäre dreidi-
35 mensionale Struktur aufweist.

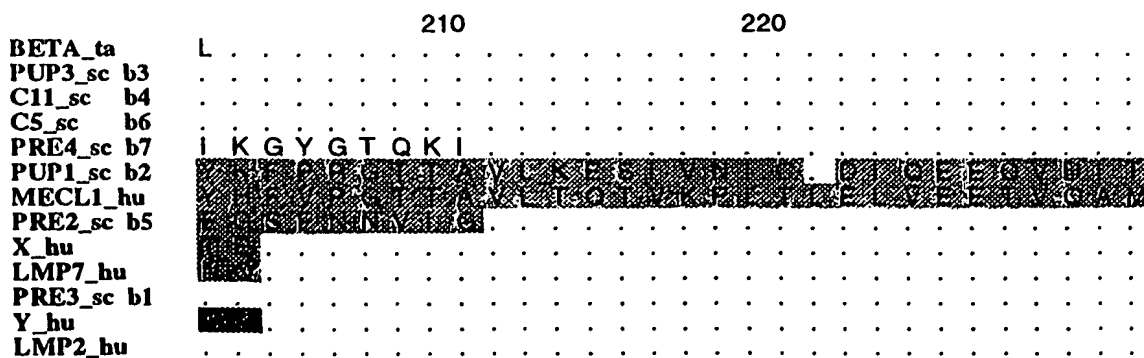
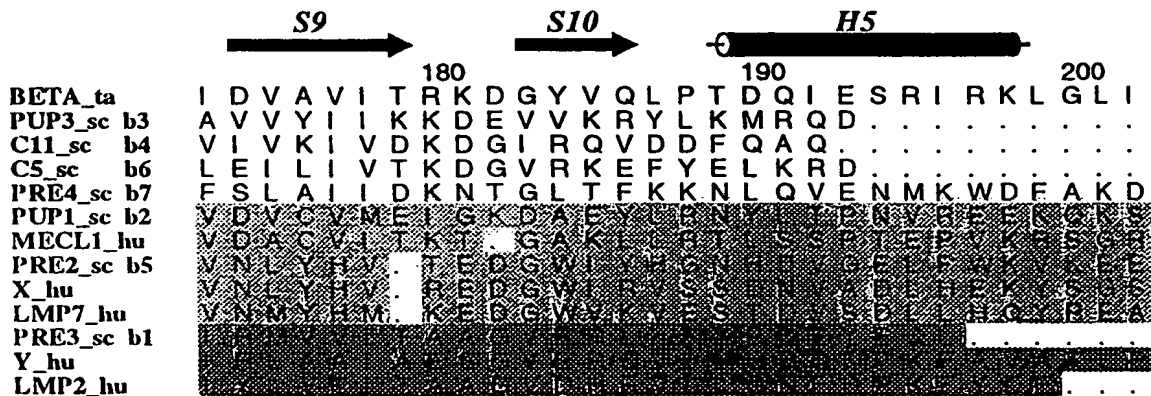
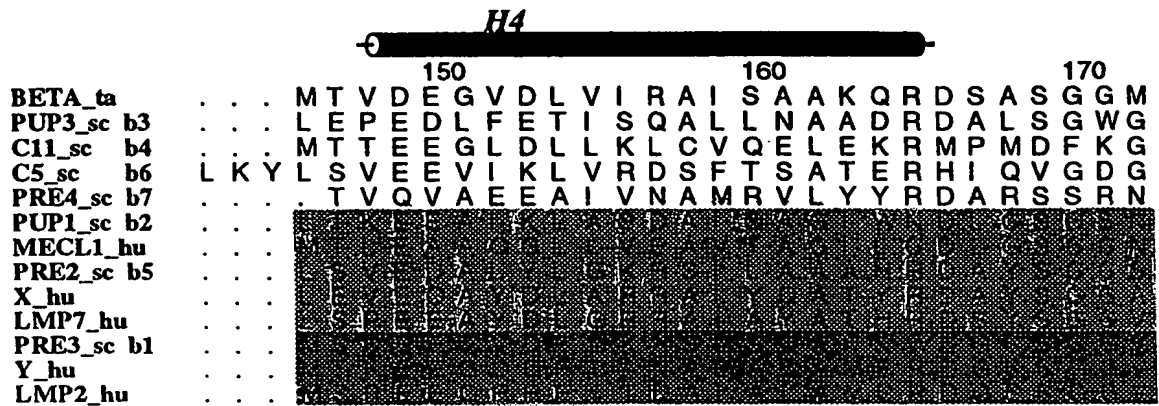
Figur 1a




Figur 1b



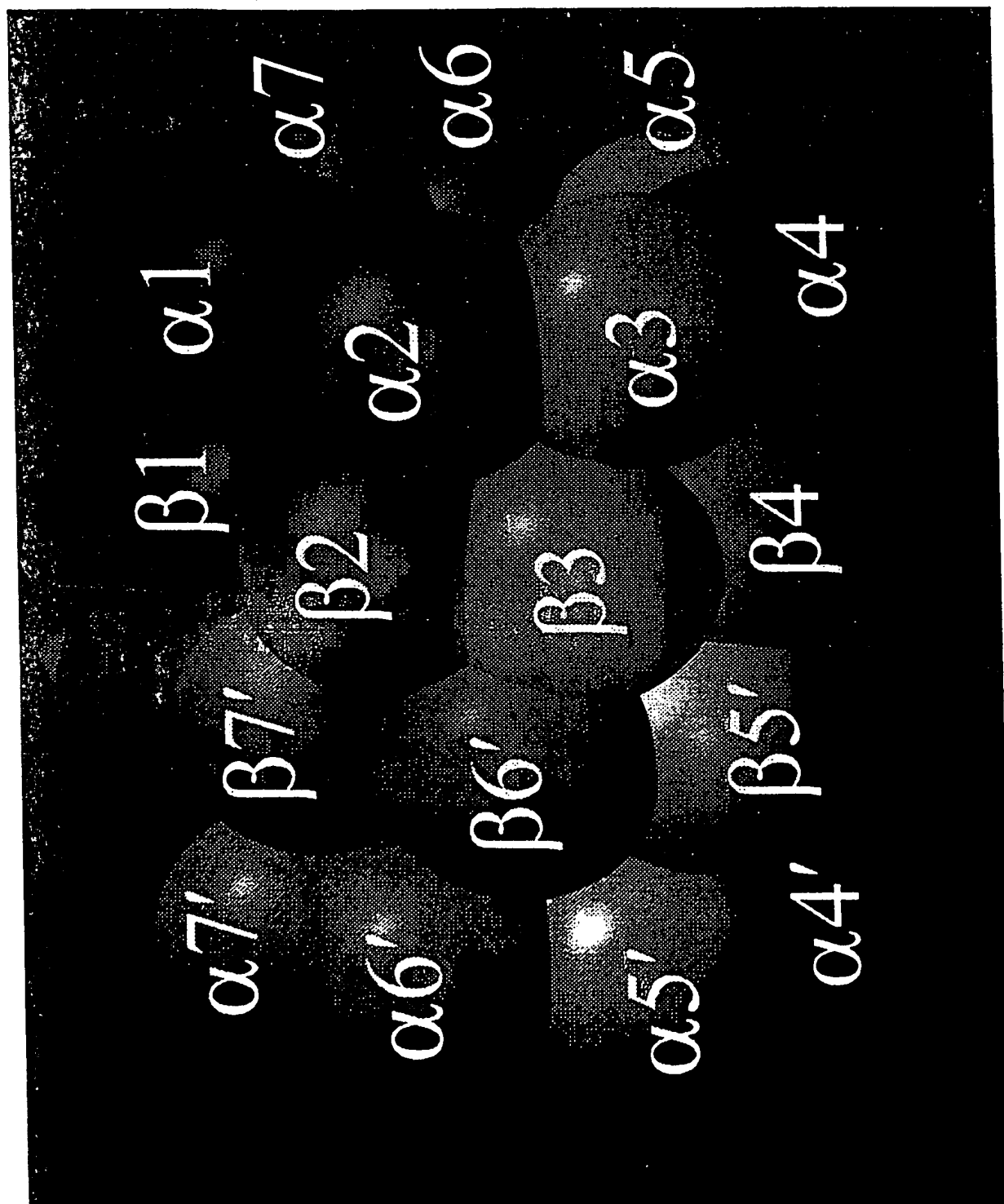
Figur 1c



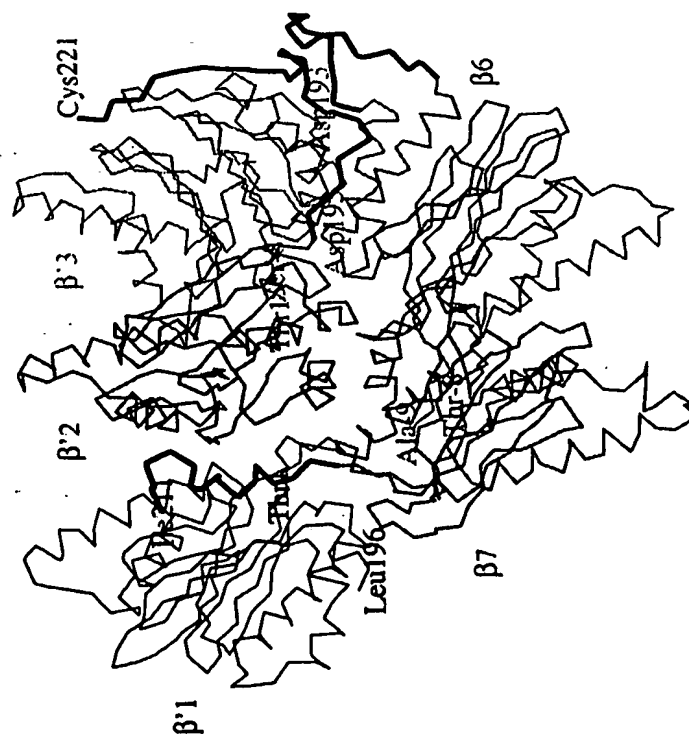
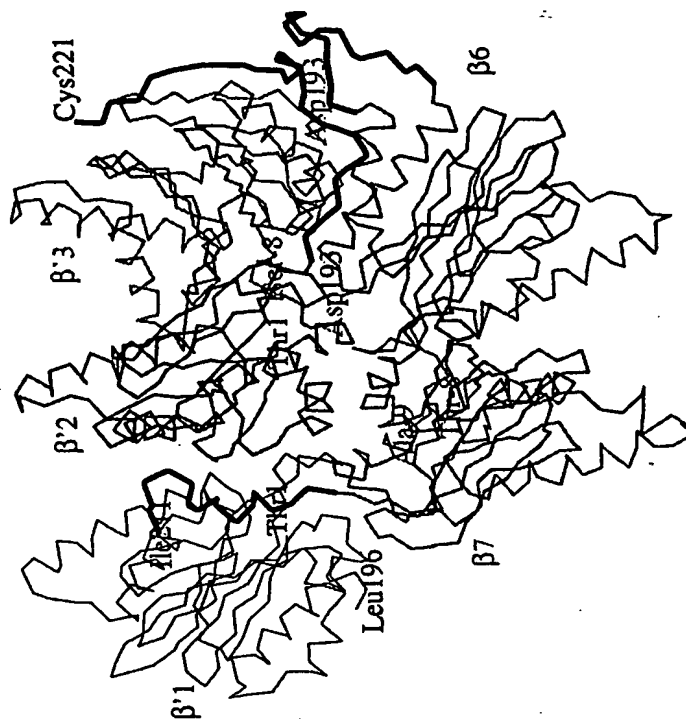
Figur 1d

BETA_ta	.	.	.
PUP3_sc b3	.	.	.
C11_sc b4	.	.	.
C5_sc b6	.	.	.
PRE4_sc b7	.	.	.
PUP1_sc b2		.	.
MECL1_hu	.	.	.
PRE2_sc b5	.	.	.
X_hu	.	.	.
LMP7_hu	.	.	.
PRE3_sc b1	.	.	.
Y_hu	.	.	.
LMP2_hu	.	.	.

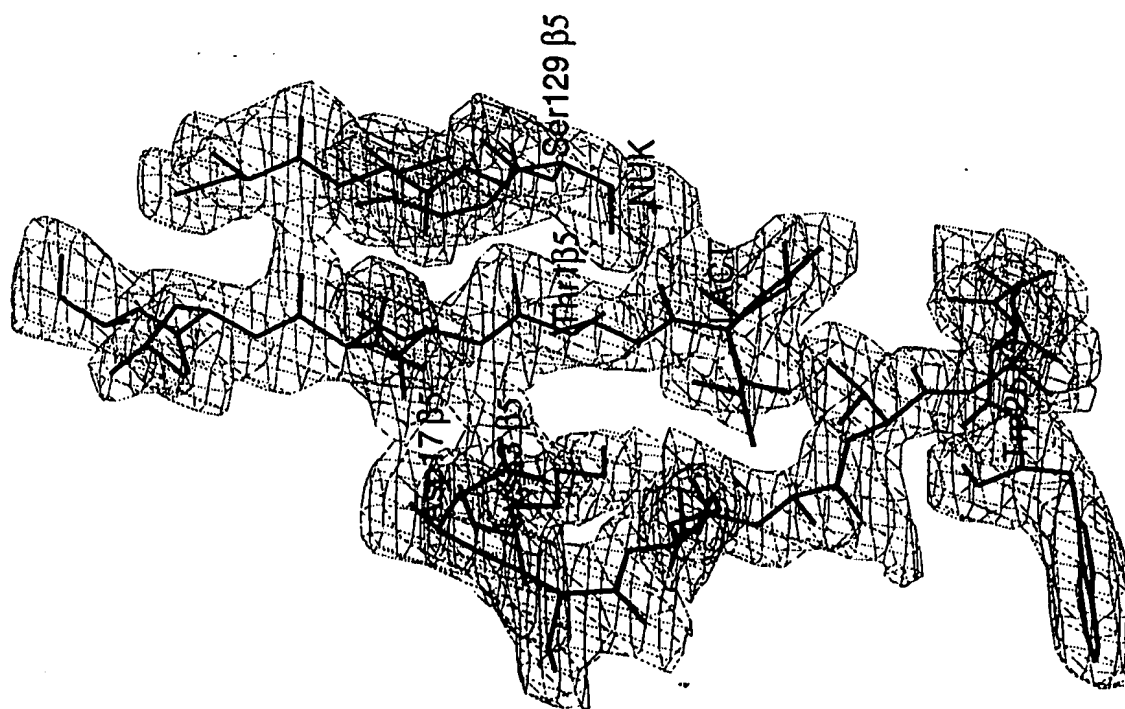
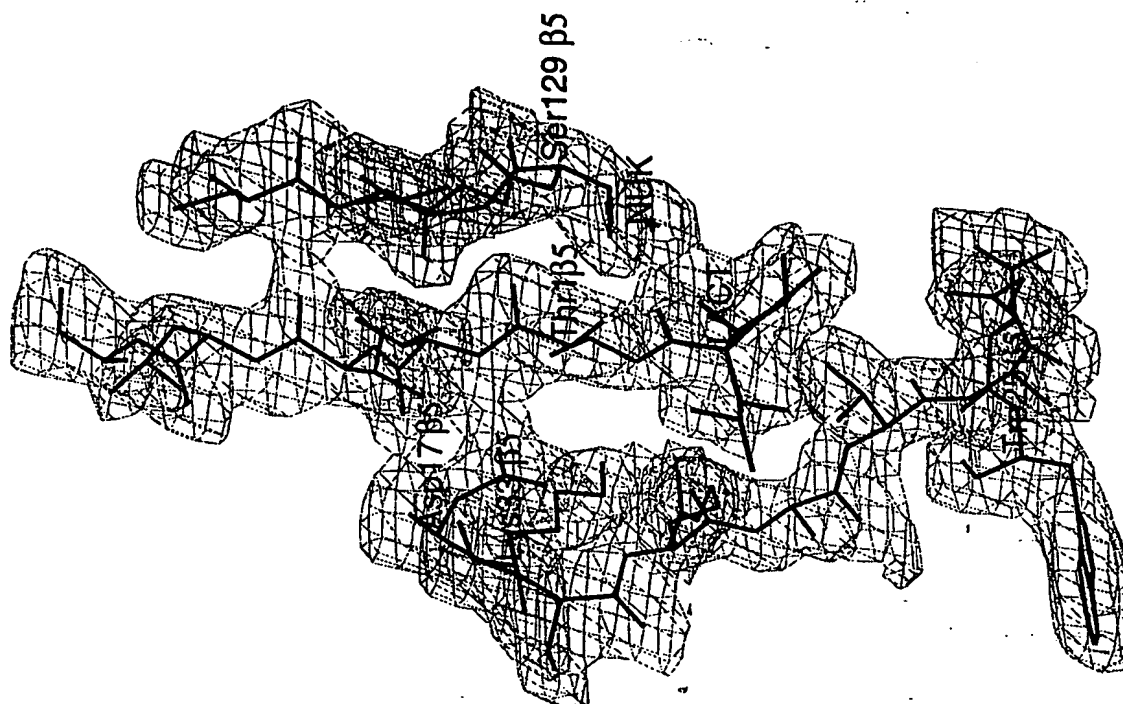
Figur 2



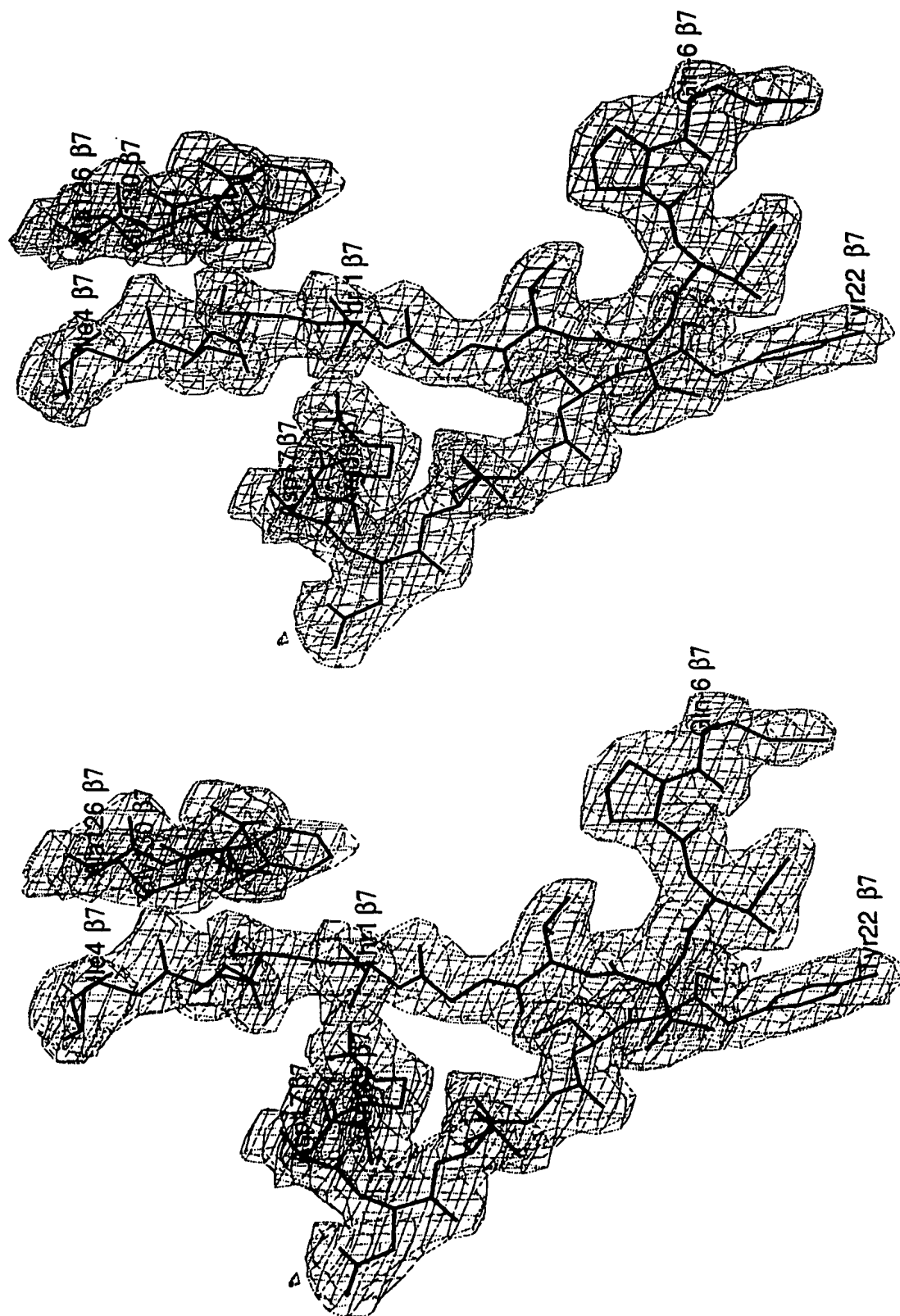
Figur 3



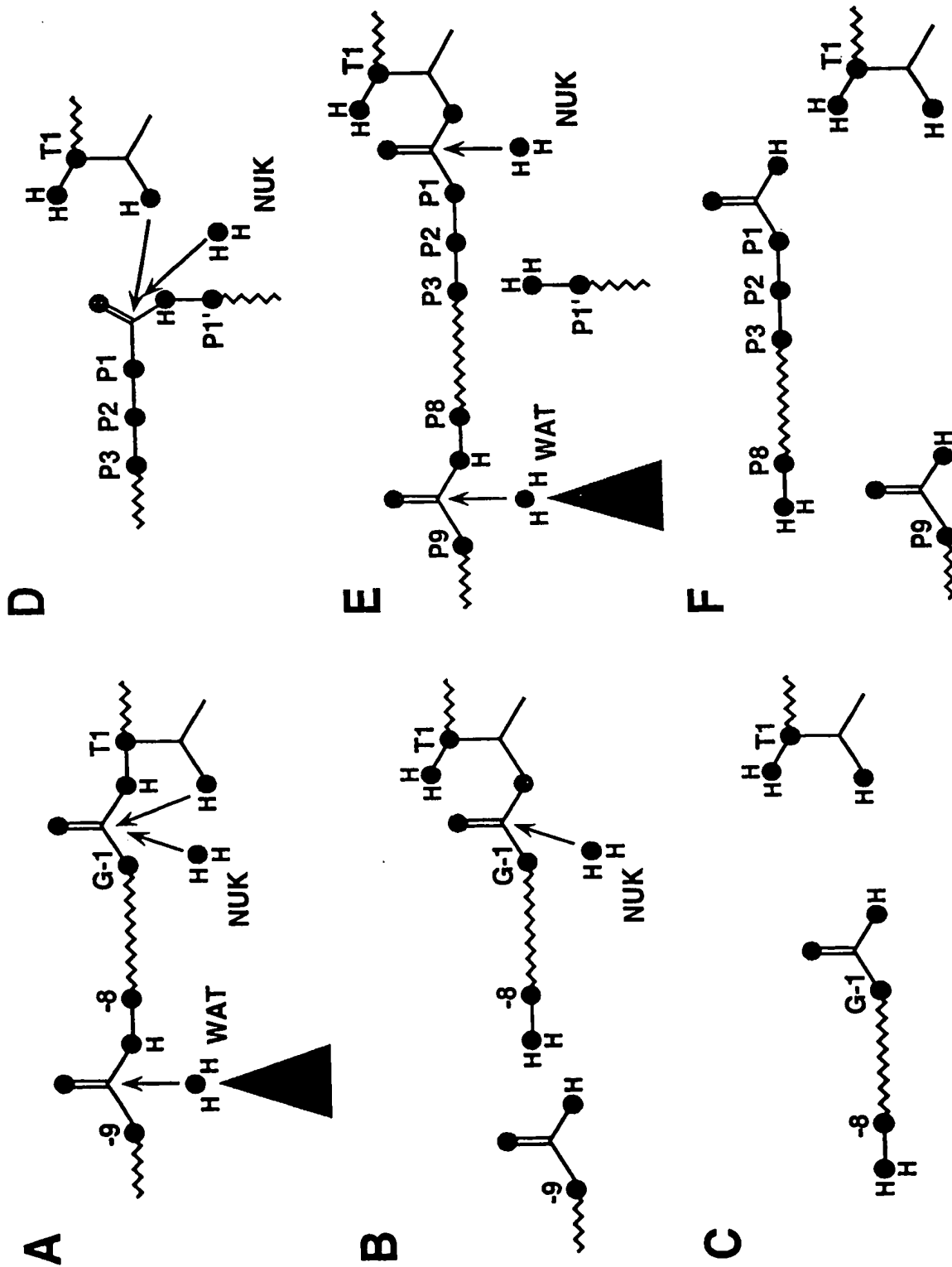
Figur 4a



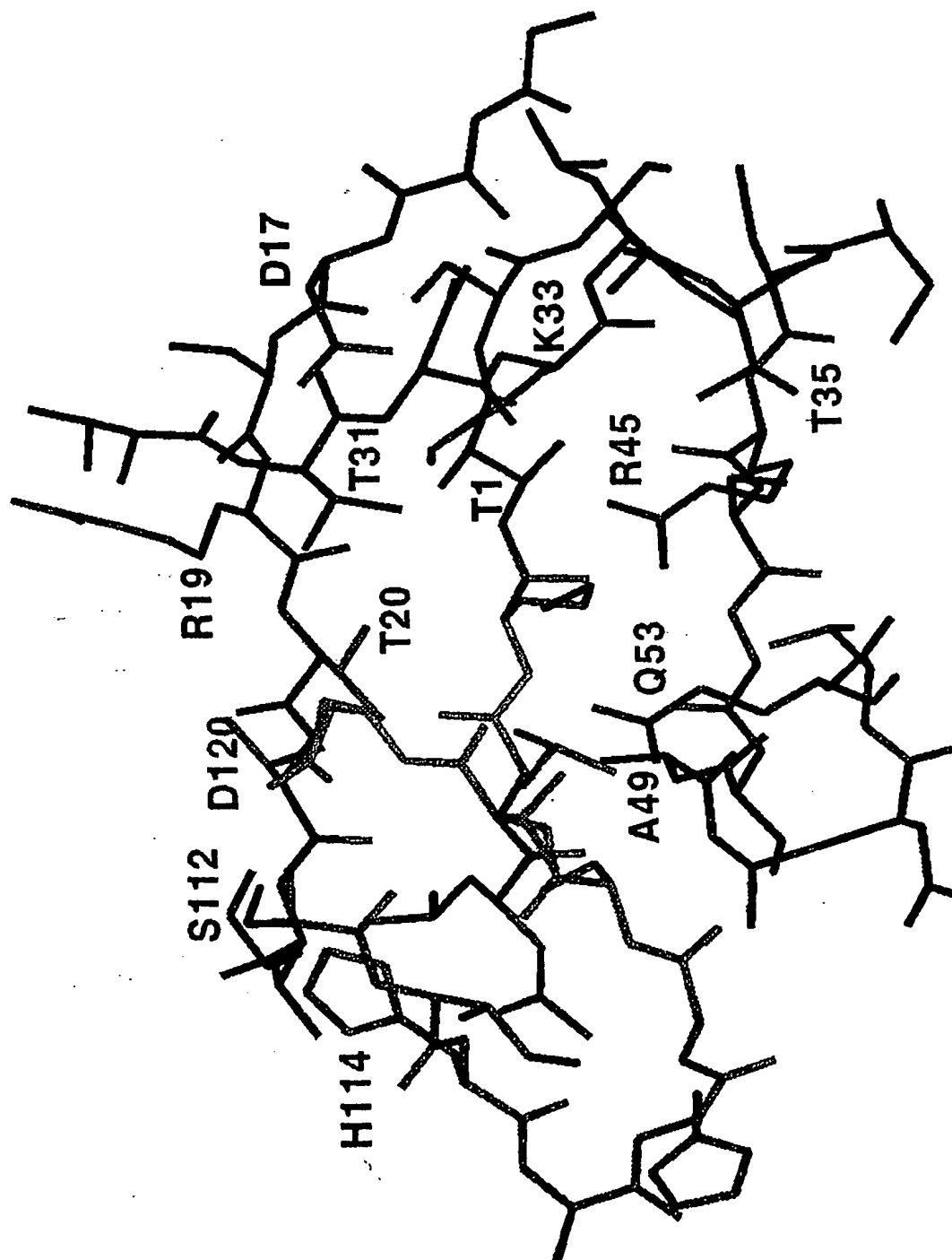
Figur 4b



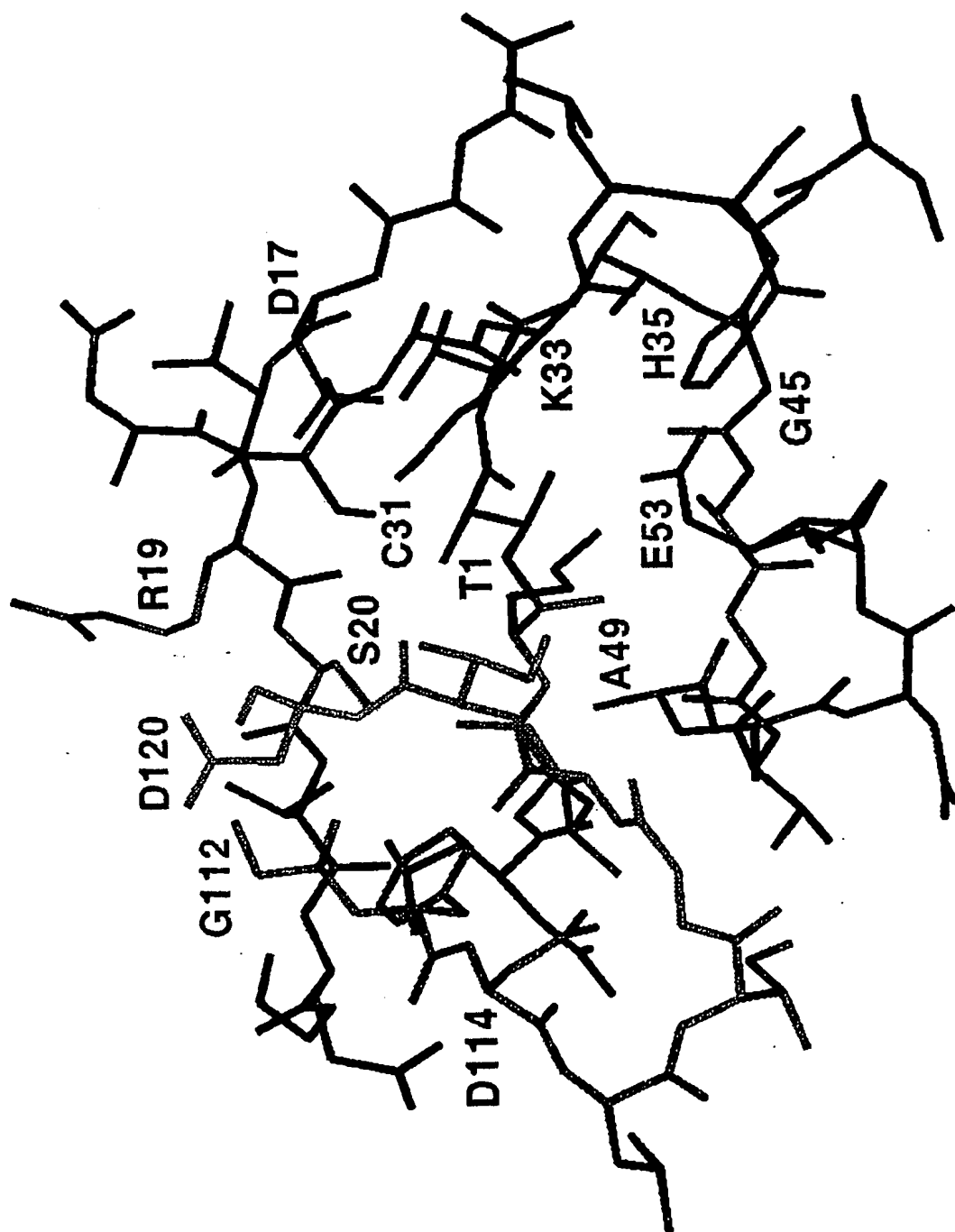
Figur 5



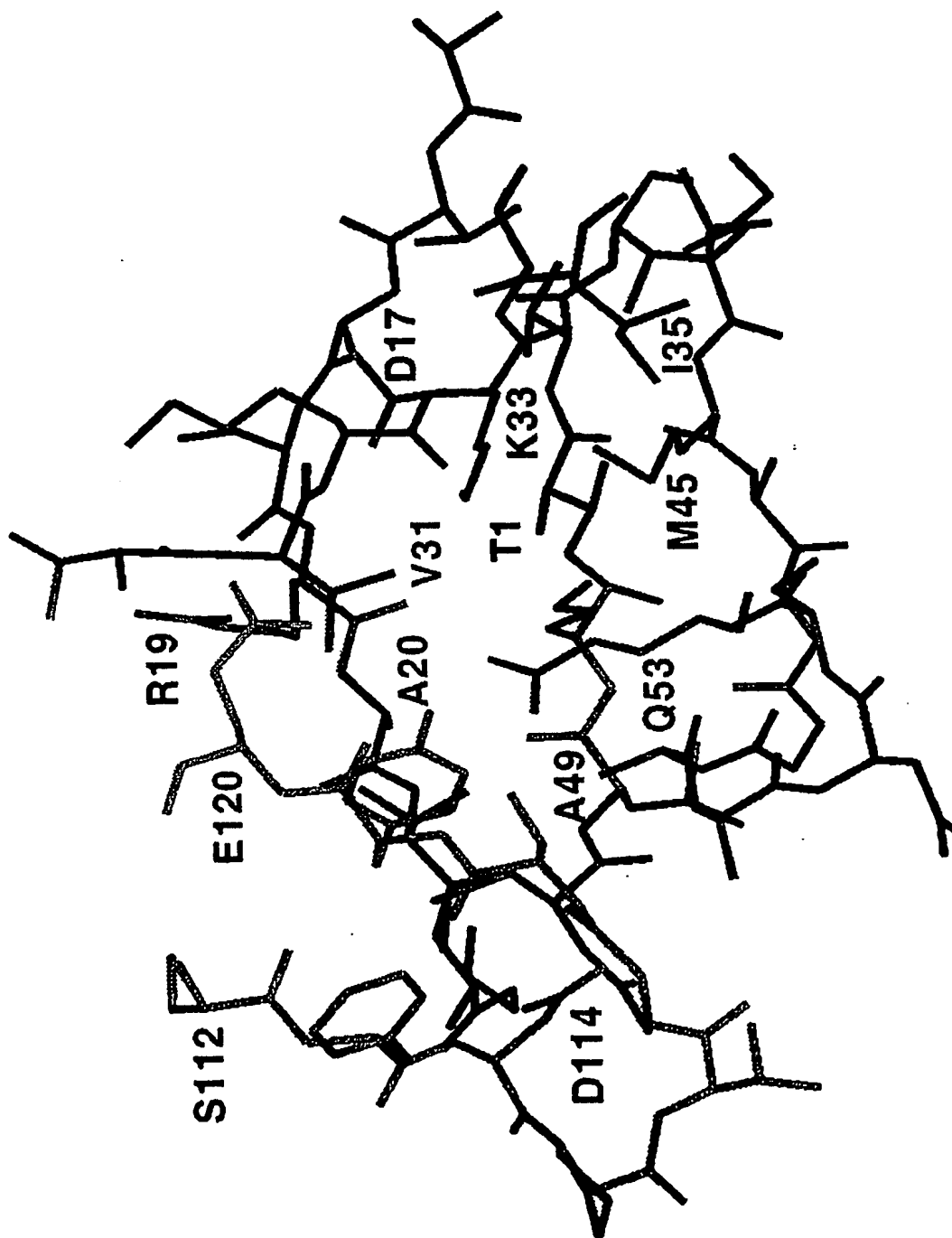
Figur 6a



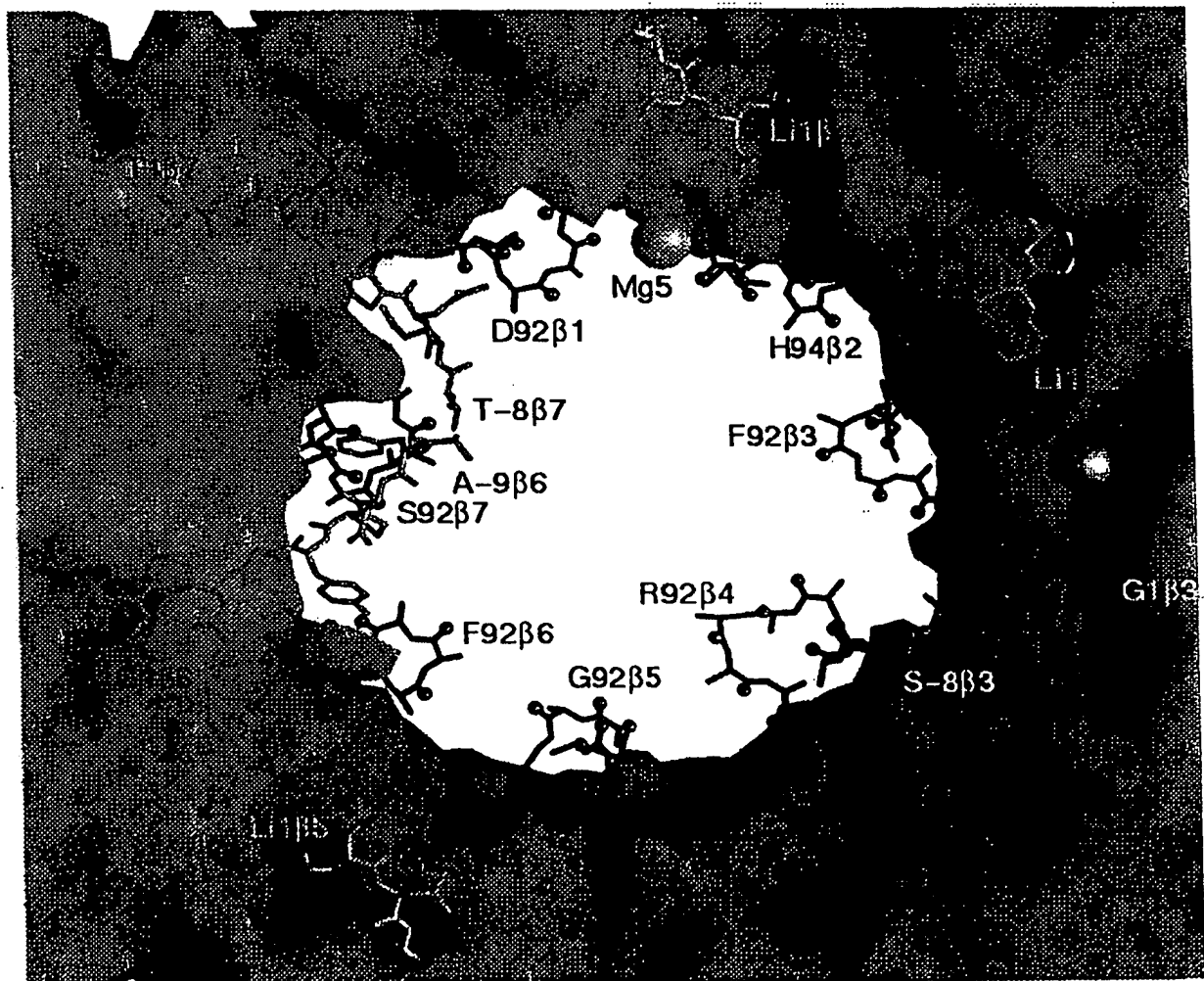
Figur 6b



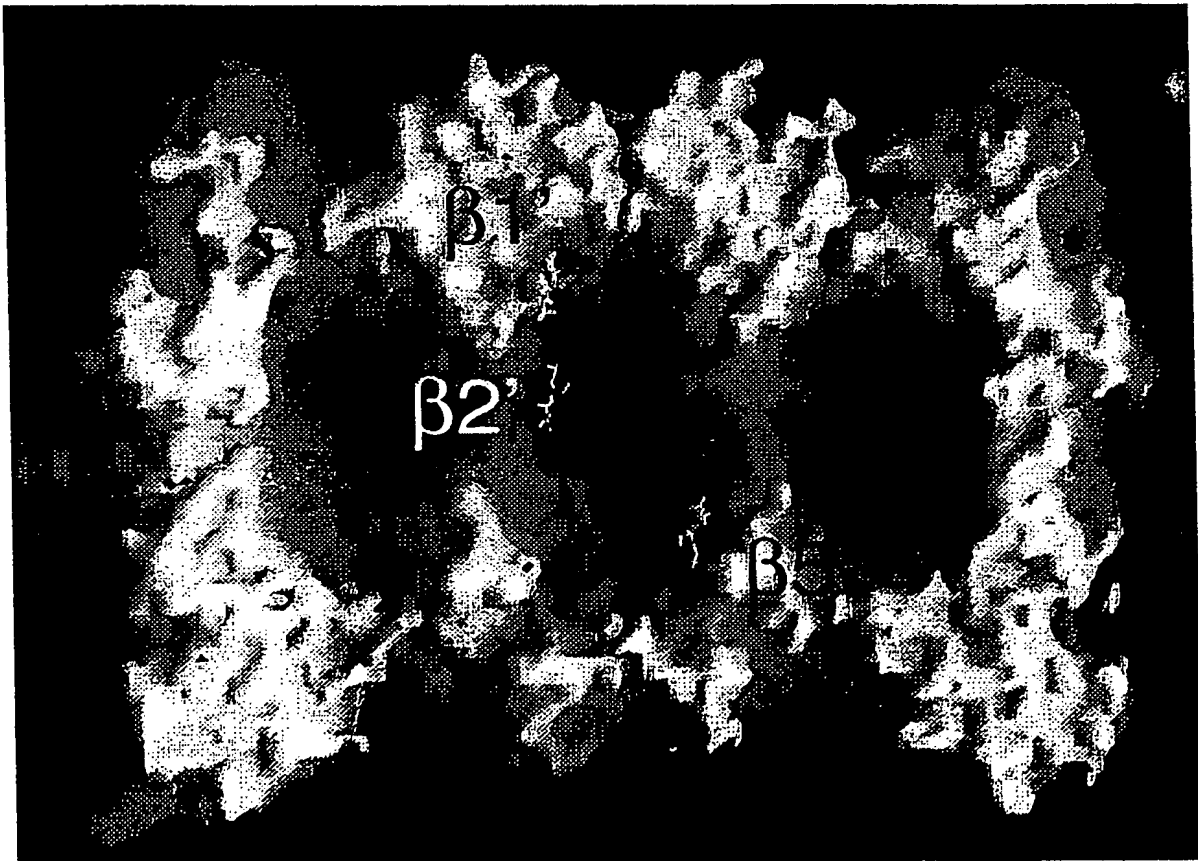
Figur 6c



Figur 7



Figur 8



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :

C12N 9/60

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/42829

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

1. Oktober 1998 (01.10.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/01653

(22) Internationales Anmeldedatum: 20. März 1998 (20.03.98)

(30) Prioritätsdaten:

97104877.2 21. März 1997 (21.03.97)

EP

(34) Länder für die die regionale oder
internationale Anmeldung eingereicht
worden ist:

DE usw.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):
BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer
Strasse 112-132, D-68305 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GROLL, Michael [DE/DE];
Türkenstrasse 11, D-80333 München (DE). HUBER,
Robert [DE/DE]; Schlesierstrasse 13, D-82110 Germering
(DE). DITZEL, Lars [DE/DE]; Astenstrasse 12, D-80689
München (DE). ENGH, Richard [US/DE]; Herbststrasse 4,
D-82234 Wessling (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9,
D-81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB,
GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW,
ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.

(54) Title: METHOD FOR THE PURIFICATION AND CRYSTALLIZATION OF PROTEASOME

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR REINIGUNG UND KRISTALLISIERUNG VON PROTEASOM

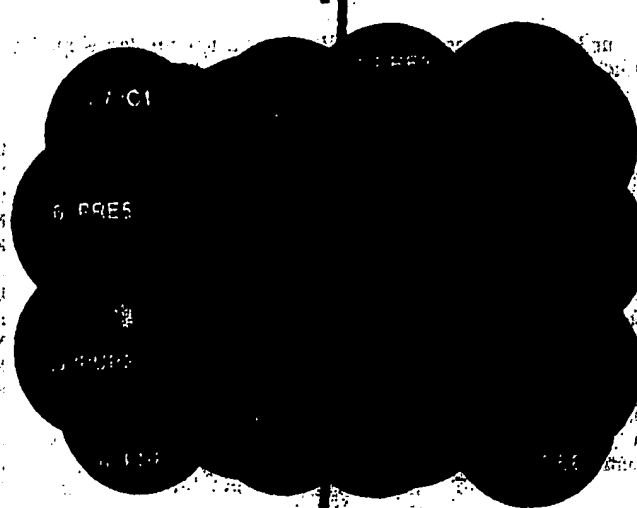
(57) Abstract

The invention relates to a method for the
production of a purified eucaryotic crystallizable
proteasome preparation, and to the proteasome
preparation obtained by this method. The inven-
tion also relates to a purified eucaryotic protea-
some preparation in crystallized form. With the
aid of crystal data from this proteasome prepara-
tion, new proteasome inhibitors can be identified
and produced, in particular with the aid of com-
puter assisted modelling programmes.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum
Gewinnen einer aufgereinigten eukaryontischen
kristallisierbaren Proteasomen-Präparation
und die durch das Verfahren erhältliche
Proteasomen-Präparation. Weiterhin betrifft
die Erfindung eine aufgereinigte eukaryontische
Proteasomen-Präparation in kristallisierter
Form. Mit Hilfe der Kristalldaten aus
dieser Proteasomen-Präparation können neue
Proteasomen-Inhibitoren, insbesondere mit Hilfe
von computergestützten Modellierung-Programmen
identifiziert und gewonnen werden.

C₂



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

VERFAHREN ZUR REINIGUNG UND KRISTALLISIERUNG VON PROTEASOM

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Gewinnen einer aufgereinigten eukaryontischen kristallisierbaren Proteasomen-Präparation und die durch das Verfahren erhältliche Proteasomen-Präparation. Weiterhin betrifft die Erfindung eine aufgereinigte eukaryontischen Proteasomen-Präparation in kristallisierter Form. Mit Hilfe der Kristalldaten aus dieser Proteasomen-Präparation können neue Proteasomen-Inhibitoren, insbesondere mit Hilfe von computergestützten Modelling-Programmen identifiziert und gewonnen werden.

Das Proteasom ist das zentrale Enzym beim Proteinabbau sowohl im Cytosol als auch im Zellkern. Es ist an vielen biologischen Prozessen beteiligt, einschließlich der Entfernung abnormaler, fehlgefalteter oder falsch assemblierter Proteine, der Reaktion auf Stress (durch Prozessierung oder Abbau von Transkriptionsregulatoren), der Zellzykluskontrolle (durch Abbau von Zyklinen), der Zelldifferenzierung und metabolischen Adaption (durch Zerstörung von Transkriptionsfaktoren oder metabolischen Enzymen) und der zellulären Immunreaktion (durch Erzeugung antigenen Peptide, die von MHC Klasse I Molekülen präsentiert werden). Für diese zellulären Funktionen, die auf einem Ubiquitin- und ATP erfordernden Abbau von Proteinen beruhen, wird das 26S Proteasom benötigt, dessen Kern und proteolytische Kammer durch das 20S Proteasom gebildet werden.

Das 20S Proteasom aus dem Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* wurde durch Röntgenstrukturkristallographie bei einer Auflösung von 0,34 nm analysiert. Es hat eine zylindrische Form mit einer Länge von 14,8 nm und einem maximalen bzw. minimalen Durchmesser von 11,3 nm bzw. 7,5 nm. Es besteht aus 28 Untereinheiten, die in einem Partikel als 14 homoheptamere

Ringe $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ mit D7 Symmetrie angeordnet sind (Löwe et al., (1995), Science 268, 533-539). Im *T. acidophilum* Proteasom ist der N-terminale Threoninrest der β -Untereinheiten die Bindestelle von inhibitorischen Peptidaldehyden und essentiell für die hydrolytische Aktivität. Auch Stock et al. ((1996), Current Opinion in Biotechnology, 7: 376-385) beschreiben die Struktur und Funktion von *T. acidophilum* Proteasomen. Eine Übertragung von *T. acidophilum*-Daten auf eukaryontische Proteasomen ist nicht möglich, da die Homologie der Proteasomen zwischen diesen Spezies zu gering ist.

Eukaryontische Proteasomen sind erheblich komplexer als das archaebakterielle Proteasom. So ist das 20S Proteasom aus *Saccharomyces cerevisiae* aus insgesamt sieben verschiedenen α -Typ und sieben verschiedenen β -Typ-Untereinheiten aufgebaut, die bereits kloniert und sequenziert wurden, vgl. z. B. Heinemeyer et al. (1994), Biochemistry 33, 12229-12237).

Die eukaryontischen 20S Proteasomen, z. B. aus Hefe und aus Säugern, sind hinsichtlich der Aminosäuresequenzen von Untereinheiten und ihrer durch Elektronenmikroskopie erkennbaren Grobstruktur sehr nahe verwandt. Die α -Typ und β -Typ Untereinheiten des Säuger 20S Proteasoms bilden eine geordnete und wohldefinierte Struktur (Kopp et al. (1995), J. Mol. Biol. 248, 264-272). In Säugerzellen können drei zusätzliche nicht essentielle Untereinheiten des 20S Proteasoms, die als LMP2, LMP7 und MECL1 bezeichnet werden, konstitutive Komponenten nach Induktion mit dem Cytokin Interferon γ ersetzen. Ihre Expression oder gezielte Deletion ändert die Peptidasespezifität des Proteasoms und die Expressionsstärke von MHC Klasse I Molekülen an der Zelloberfläche.

Hilt, Heinemeyer und Wolf ((1993), Enzyme Protein 47: 189-201) beschreiben den Aufbau von 20S und 26S Hefeproteasomen sowie die proteolytische Aktivität von β -Typ-Untereinheiten. Ferner werden die unterschiedlichen Funktionsweisen von 20S und 26S Proteasomen hinsichtlich des Stoffwechsels und der Differen-

zierung einer Zelle diskutiert. Kristallographische Daten von eukaryontischen Proteasomen werden nicht beschrieben.

In der Veröffentlichung Rivett et al. (1994), Methods Enzymol., 244, 331-350) und den darin enthaltenen Zitaten sind bisher zur Aufreinigung von Proteasomen verwendete Ausgangsmaterialien, z. B. Gewebe und Zellen von Säugern, wie Maus, Ratte, Mensch oder Rind, anderen Tieren, Pflanzen und Hefe aufgelistet.

Auch in der Patentliteratur finden sich zahlreiche Dokumente, die Proteasomen betreffen. So wird beispielsweise die Herstellung von eukaryontischen Proteasomen in EP-A-03 45 750, JP-A-05 292 964 und JP-A-06 022 759 beschrieben. Die dort offenbarten Proteasomen-Präparationen besitzen jedoch keine ausreichende Reinheit, um eine Kristallisierung zu ermöglichen.

Morimoto et al. ((1995), J. Biochem. 117, 471-474), Hwang et al. ((1994), Mol. Cells, Vol. 4, 273-275) und Perkins et al. ((1994), Journal of Structural Biology 113, 124-134) beschreiben die Kristallisierung von eukaryontischen Proteasomen. Aufgrund der geringen Reinheit der Proteasomen-Präparationen werden lediglich Auflösungen von 0,44 nm, > ca. 5,0 nm bzw. 1,5 nm erreicht, so daß eine Strukturbestimmung oder ein Molecular Modelling mit diesen Proteasomen-Präparationen nicht möglich ist.

Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Proteasomenuntereinheiten werden beispielsweise in den japanischen Anmeldungen JP-A-04 077 497, JP-A-04 077 498, JP-A-04 117 283, JP-A-05 317 059, JP-A-07 255 476, JP-A-08 116 972, JP-A-08 205 871 und JP-A-08 217 796 sowie im japanischen Patent 40 51 896 beschrieben.

Inhibitoren für das Proteasom sind beispielsweise in JP-A-05 000 968, WO 92/20 804, WO 94/17 816, WO 95/24 914, WO 95/25

533, WO 96/13 266, WO 96/32 105 (Lactacystinanaloga) und US-A-55 80 854 (Peptidaldehydinhibitoren) beschrieben.

Klafky et al. ((1995), Neuroscience Letters 201, 29-32) untersuchen die Wirkung des Proteasominhibitors Calpain Inhibitor 1 auf die Sekretion von β -Amyloid-Peptid, das durch Spaltung des β -Amyloid-Precursor-Proteins (APP) entsteht, und das als ein Auslöser der Alzheimer Krankheit diskutiert wird. Proteasom-Strukturdaten sind in dieser Publikation nicht enthalten.

10

Fenteany et al. ((1995), Science, Vol. 268, 726-731) beschreiben den Streptomyces Metaboliten Lactacystin als Zellzyklusinhibitor und Induktor für Neuritenauswachsen einer Maus Neuroblastomazelllinie. Als spezifisches zelluläres Ziel dieses
15 Inhibitors wurde das 20S-Proteasom mittels Tritzium-markiertem Lactacystin identifiziert. Eine kristallisierbare Proteasomen-Präparation wird nicht beschrieben.

WO 91/13904 beschreibt die Identifizierung und Charakterisierung einer Chymotrypsin-ähnlichen Protease, die als multikatalytische Protease vorliegt sowie deren Verwendung zur Behandlung der Alzheimer Krankheit. Die Verwendung von für Chymotrypsin-Aktivität-spezifischen Substraten zum Testen oder
20 Sreenen von Inhibitoren wie hierin beschrieben, führt ausschließlich zur Identifizierung von Inhibitoren, die spezifisch für eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität sind.

Somit wird ersichtlich, daß ein großes Bedürfnis nach weiteren Erkenntnissen über Proteasomen, insbesondere hinsichtlich
30 deren genauen Struktur besteht, um die Herstellung von neuen Proteasomeninhibitoren auf rationale Weise zu ermöglichen. Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, ein Verfahren bereitzustellen, das die Kristallisierung eukaryontischer Proteasomenpräparationen ermöglicht, so daß mit
35 Hilfe der Kristallstruktur die Entwicklung neuer Inhibitoren vereinfacht wird.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum Gewinnen einer aufgereinigten eukaryontischen Proteasomenpräparation, umfassend die Schritte:

- (a) Herstellung eines Rohextrakts durch Aufschluß von eukaryontischen Zellen,
- (b) Abtrennung unlöslicher Bestandteile aus dem Rohextrakt,
- (c) chromatographische Auftrennung in Fraktionen über ein Ionenaustauschermedium, z. B. Q-Sepharose,
- (d) Testen der in Schritt (c) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen,
- (e) chromatographische Auftrennung über Hydroxyapatit,
- (f) Testen der in Schritt (e) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen,
- (g) Konzentrierung der vereinigten Fraktionen,
- (h) chromatographische Auftrennung über ein Gelfiltrationsmedium in einem Molekulargewichtsbereich von 5 kD bis 5 MD, z. B. Superose und
- (i) Testen der in Schritt (h) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen.

Als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren können beliebige eukaryontische Zellen eingesetzt werden, z. B. Tierzellen, Pflanzenzellen oder Pilzzellen wie etwa Hefezellen. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Hefezellen, z. B. *Saccharomyces cerevisiae*.

Das Testen der Fraktionen während des Anreicherungsprozesses erfolgt üblicherweise durch Bestimmung der für Proteasomen typischen proteolytischen Aktivität. Als Substrate können hierbei beispielsweise bekannte chromogene Peptide eingesetzt werden. Vorzugsweise erfolgt das Testen der Fraktionen derart, daß man jeweils zwei parallele Bestimmungen der proteolytischen Aktivität durchführt, wobei die eine in Abwesenheit und die andere in Gegenwart eines Proteasomeninhibitors, z. B. Lactacystin, durchgeführt wird. Diese Art des Testens erlaubt eine eindeutige Unterscheidung der Proteasomen enthaltenden

Fraktionen von anderen Fraktionen mit proteolytischer Aktivität.

Die Durchführung der Anreicherung umfaßt drei chromatographische Trennschritte (c), (e) und (h), von denen mindestens einer in einem FPLC-System durchgeführt werden kann, z. B. Schritt (h).

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird eine aufgereinigte Proteasomen-Präparation erhalten, die in einer ausreichenden Menge und Reinheit vorliegt, so daß eine nachfolgende Kristallisierung ermöglicht wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine aufgereinigte eukaryontische Proteasomenpräparation, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich ist. Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine aufgereinigte eukaryontische Proteasomen-Präparation in kristallisierbarer Form. Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine aufgereinigte kristallisierte eukaryontische Proteasomen-Präparation.

Die kristallisierte Proteasomen-Präparation kann auch einen Proteasomen-Inhibitor enthalten. Beispiele für geeignete bekannte Proteasomen-Inhibitoren sind Lactacystin oder Analoga davon bzw. Tripeptid-Aldehyde wie Calpaininhibitor.

Die erfindungsgemäße eukaryontische Proteasomen-Präparation umfaßt ein 20S Proteasom, d. h. einen Komplex aus 28 Untereinheiten, der jeweils 2 Moleküle von sieben verschiedenen α -Typ-Untereinheiten und sieben verschiedenen β -Typ-Untereinheiten enthält. Darüber hinaus kann der Komplex noch Metallionen, z. B. Magnesium, Lösungsmittelmoleküle, z. B. Wasser, und andere Polypeptidkomponenten enthalten.

Die erfindungsgemäße aufgereinigte eukaryontische Proteasomenpräparation kann zur Identifizierung und Gewinnung neuer Pro-

teasomen-Inhibitoren eingesetzt werden. Dabei werden insbesondere Daten aus der Kristallstruktur von kristallisierten eukaryontischen Proteasomen-Präparationen eingesetzt. Die Identifizierung und Gewinnung neuer Proteasomen-Inhibitoren erfolgt vorzugsweise in einem computergestützten Modellprogramm.

Beispielsweise kann das Inhibitor-Design durch visuelle Inspektion graphischer Darstellungen der Struktur erfolgen und zwar insbesondere

- 10 (a) durch Bestimmung der für Liganden zugänglichen Volumina an aktiven Stellen; z. B. mit Hilfe der Programme INSIGHT, SYBYL, QUANTA, FRODO, O etc.,
- (b) durch Bestimmung von idealen Ligandeneigenschaften hinsichtlich Hydrophobizität oder Wasserstoffbrückenbindungen, z. B. mit Hilfe der Programme LUDI, GRID etc. oder/und
- 15 (c) durch Bestimmung der elektronischen Eigenschaften von für Liganden zugänglichen Oberflächen an den aktiven Stellen; z. B. mit Hilfe des Programms GRASP etc.

Alternativ oder zusätzlich können Liganden durch automatisierte Ligandenfragment-Andock- oder Anpassprozeduren, z. B. mit Hilfe der Programme DOCK, LUDI, LEAPFROG etc. ermittelt werden.

Besonders bevorzugt werden für diesen Zweck die Kristalldaten der Proteasomuntereinheiten vom β -Typ, insbesondere der Proteasom-Untereinheiten $\beta 5$ /PRE2, $\beta 1$ /PRE3 oder/und $\beta 2$ /PUP1 bzw. homologer Untereinheiten aus anderen eukaryontischen Proteasomen sowie benachbarte Untereinheiten davon, z. B. $\beta 4$ /C11 oder/und $\beta 7$ /PRE4 verwendet.

35 Für das Design von Inhibitoren des humanen Proteasoms können die erfindungsgemäßen Kristallstrukturdaten des Hefeproteasoms mit bekannten Aminosäuresequenzen des humanen Proteasoms durch

Homologiemodelling modifiziert werden. Ein solches Homologiemodelling kann durch molekulare Grafikprogramme wie etwa O, INSIGHT, FRODO, etc. durchgeführt werden. Insbesondere erfaßt die vorliegende Erfindung ein Homologiemodelling der homologen aktiven Stellen der aktiven Monomere im allgemeinen und insbesondere zum Zwecke des Inhibitor designs. In Figur 1 ist die Homologie der Aminosäuresequenzen des Hefeproteasoms und des humanen Proteasoms in den relevanten Bereichen gezeigt.

10 Weiterhin soll die Erfindung durch nachfolgenden Beispiele und Figuren erläutert werden. Es zeigen:

Figur 1 die Homologie zwischen den für die aktiven Untereinheiten des Proteasoms kodierenden Aminosäuresequenzen aus Hefe und Mensch; die $\beta 1$ /PRE3, $\beta 2$ /PUP1, $\beta 5$ /PRE2 Subfamilien sind gelb, grün bzw. blau dargestellt; die Reste der S1-Tasche, welche die Spezifitätsänderungen der PRE3 Subfamilie nach Substitution der humanen Untereinheit Y durch LMP2 nach Cytokininduktion beeinflussen, sind braun gezeichnet;

Figur 2 die Topologie der 28 Untereinheiten des 20S Proteasoms, gezeichnet als Kugeln,

Figur 3 die C $^{\alpha}$ -Kettenpositionen der Untereinheiten $\beta 7$ /PRE4, $\beta 6$ /C5, $\beta 1'$ /PRE3, $\beta 2'$ /PUP1 und $\beta 3'$ /PUP3, in denen die β -cis und β -trans- β -Wechselwirkungen durch Kontakte von Insertionssegmenten hervorgehoben sind,

Figur 4a bis b Elektronendichtekarten (Konturiert ab 1 σ) in ähnlichen Orientierungen um THR1 mit zwei F $_o$ -F $_c$ -Coeffizienten nach zweifacher Mittlung; die roten Modellteile wurden über die Phasengebung weggelassen. $\beta 5$ /PRE2 mit dem kovalent gebundenem Lactacystin (LACT) und dem Wassermolekül

- 9 -

NUK (a) und $\beta 7/\text{Pre4}$ mit einem Teil eines Pro-peptids (b),

Figur 5 ein Schema der vorgeschlagenen chemischen Schritte von Autolyse und Substrathydrolyse. Erzeugung eines Prozessierungsintermediats durch Hydrolyse an der "sauren" β -Ringfläche (A). Erzeugung der vollständig prozessierten aktiven Untereinheit über ein Acyl-Enzym (B) und dessen Hydrolyse (C). Michaelis-Komplex eines Substratpolypeptids (D). Spaltung an der β -Ringfläche und Bildung mit Peptidspaltung assoziierten Acyl-Enzyms (E). Acyl-Enzym-Hydrolyse und Freisetzung des Octapeptidprodukts (F).

Figur 6a bis c die Bindung des Calpaininhibitors und die S1-Taschen, $\beta 1/\text{PRE3}$ ist in Grau mit den P1 kontaktierenden Resten in Rot dargestellt; $\beta 2/\text{PUP1}$ ist in Grün und der Inhibitor in Blau (a) dargestellt; $\beta 2/\text{PUP1}$ (b), $\beta 5/\text{PRE2}$ (c) mit analogen Farbgebungen;

Figur 7 die untere Hälfte der β - β -Kammer. Die Hauptkette mit roten Kreisen für die Carbonylsauerstoffe ist für die C-terminalen Abschnitte der Helices H2 der sieben β -Typ Untereinheiten, die die β -Ringfläche definieren, angegeben. Die intermediär prozessierten und die unprozessierten Propeptide der Untereinheiten $\beta 6/\text{C5}$, $\beta 7/\text{PRE4}$, $\beta 3/\text{PUP1}$ und $\beta 4/\text{C11}$ (grün) und der Calpaininhibitor (gelb) gebunden an $\beta 1/\text{PRE3}$, $\beta 2/\text{PUP1}$ und $\beta 5/\text{PRE2}$ sind gezeigt. Zwei Magnesiumionen, die nahe der β -Ringfläche lokalisiert sind, sind als silberne Kreise gezeichnet; und

Figur 8 zeigt eine Oberflächenansicht des Proteasomenmoleküls, geschnitten längs der Zylinderachse. Drei der sechs Calpaininhibitormoleküle, gebunden an $\beta 1$ /PRE3, $\beta 2$ /PUP1 und $\beta 5$ /PRE2, sind als raumfüllende Modelle in rot dargestellt. Die abgedichteten α -Öffnungen an beiden Enden des Partikels, einige wenige schmale Seitenfenster und die scharf abgeschnittenen inneren β -Ringflächen sind zu erkennen.

10

Beispiele

Beispiel 1 Proteinpräparation und Charakterisierung

15 Hefezellen von *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe-Mayr, München, Deutschland) wurden zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen und in Puffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM NaN_3) in einem Gewichtsverhältnis Zellen zu Puffer von 2:3 suspendiert. Die Zellen wurden für 10 Min in einer Mühle (Biomatik, 20 Deutschland) mit Glaskugeln (Durchmesser: 0,5 mm; Volumenverhältnis Glaskugeln zu Zellsuspension: 3:2) desintegriert. Das Aufbrechen der Zellen wurde mikroskopisch überwacht.

Nach Filtration wurde der Rohextrakt für 10 min bei 10.000 x g 25 in einer Sorvall RC 2B Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut 45 min bei 134.000 x g in einem Ti-55,2 Rotor (Beckmann) zentrifugiert. Die Lipide aus der obersten Schicht wurden sorgfältig entfernt und die verbleibenden gelben Lösungen vereinigt. Die Proteinkonzentrationen waren etwa 30 50 mg/ml.

Unmittelbar nach der Zentrifugation wurde der Extrakt auf eine Q-Sepharosesäule (5 x 20 cm) aufgebracht, die mit 280 mM NaCl in Puffer A äquilibriert war. Die Säule wurde mit 280 mM NaCl 35 in Puffer A gewaschen, die Proteine wurden mit einem Gradienten von 280 bis 800 mM NaCl eluiert. Die Durchflußrate war 120 ml/h und es wurden 12 ml Fraktionen gesammelt. Das Protea-

som wurde bei 400 - 450 mM NaCl eluiert. In allen Fraktionen wurden Chymotrypsin-artige (CL), Peptidylglutamyl-Peptidhydrolase (PGPH) und Trypsin-artige (TL) enzymatische Aktivitäten gemessen.

5

Um das 20S Proteasom zu erhalten, wurde von allen aktiven Fraktionen in Gegenwart von Lactacystin erneut die CL-Aktivität gemessen und die Fraktionen mit verringerten Aktivität wurden gesammelt. Die vereinigten Fraktionen wurden dreifach mit Wasser verdünnt und auf eine Hydroxyapatitsäule (3 x 10 cm) aufgetragen, die mit 60 mM Kaliumphosphat, pH 7,5 äquilibriert war. Die Säule wurde mit 60 mM Kaliumphosphat pH 7,5 gewaschen und mit einem Gradienten von 60-300 mM Kaliumphosphat eluiert wird. Die Durchflußrate war 60 ml/h. Es wurden 12 ml Fraktionen gesammelt. Die CL-, PGPH- und TL-Aktivität wurde in allen Fraktionen gemessen und die aktiven Fraktionen wurden vereinigt.

Die vereinigten Fraktionen wurden zwanzigfach durch Ultrafiltration unter Verwendung einer AMICON YM30 Membran konzentriert und das Konzentrat wurde auf eine Superose 6 Säule (1 x 30 cm) äquilibriert mit Puffer A aufgetragen. Die Elution wurde mit einer Durchflußrate von 18 ml/h in Puffer A durchgeführt. Das Proteasom eluierte nach 37 min. Aus 500 g Hefezellen konnten auf diese Weise 50 mg kristallisierbares Protein erhalten werden.

Alle präparativen Schritte mit Ausnahme der FPLC wurden bei 4°C ausgeführt. Die chromogenen Peptidsubstrate wurden in Dimethylsulfoxid bei einer Konzentration von 1 mM gelöst. Die proteolytische Aktivität gegen diese Substrate wurde gemäß Achtstetter et al. (1994), J. Biol. Chem. 259, 13344-13348, bestimmt. Die chromogenen Peptidsubstrate wurden von Bachem (Bubendorf, Schweiz) bezogen. Q-Sepharose und Hydroxyapatit stammten von Sigma und BioRad. Die FPLC Vorrichtung, die MonoQ- und Superose 6 Säule stammten von Pharmacia (Freiburg,

(Deutschland), alle anderen Chemikalien wurden in der höchstmöglichen Reinheit von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Beispiel 2 Kristallisierung

5

Die Kristalle wurden in Hängetropfen bei 24 °C gezüchtet. Die Proteinkonzentration, die zur Kristallisation verwendet wurde, war 40 mg/ml in 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) und 1 mM EDTA. Die Tropfen bestanden aus 4 µl der Proteinlösung und 2 µl einer Reservoirlösung, die 40 mM Magnesiumacetat, 0,1 M Morpholinoethansulfonsäure (pH 6,5) und 12 % 2,4-Methylpentandiol enthielt. Die den Inhibitor Lactacystin enthaltenden Kristalle wurden durch Eintauchen in eine 1 mM Lactacystinlösung für 6 h hergestellt. Die den Inhibitor Acetyl-Leu-Leu-Norleucin (Calpain Inhibitor I, Boehringer Mannheim) enthaltenden Kristalle wurden durch Eintauchen in eine 5 mM Calpainlösung für 6 h hergestellt. Die kristallographischen Daten sind in Tabelle 1 angegeben.

20. Beispiel 3 Kristallographie

Die Kristalle waren sehr gut geordnet und zeigten nur eine leichte Anisotropie. Somit wurde eine Auflösung von 0,24 nm möglich. Die Acetyl-Leu-Leu-Norleucin-inhibierten Kristalle hatten eine etwas verringerte Ordnung.

Die Anisotropie der Diffraktion wurde unter Verwendung der gefundenen Strukturfaktoramplituden mit solchen korrigiert, wie sie aus einem Modell mit isotropen Temperaturfaktoren unter Verwendung von XPLOR (Bruenger, 1992) berechnet wurden. Die Datensätze wurden bei der BW6-Beamline am DESY Hamburg mit einer Synchrotronstrahlung von $\lambda = 0,11$ nm erhalten. Die Kristalle wurden in einen Gefrierschutzpuffer (30 % MPD, 28 mM Magnesiumacetat, 0,1 M Morpholinoethansulfonsäure, pH 6,9) eingetaucht und in einem Strom von 90 °K kaltem Stickstoffgas gefroren. Die Diffraktionsdaten wurden mit einer 300 mm Mar Forschungs-Imagingplatte in einer Entfernung von 275 mm (LACT)

oder 280 nm (CAL) gesammelt. Die Bestimmung von Röntgenintensitäten erfolgte mit dem MOSFLM Computerprogramm Version 5.3 und die Datenreduktion wurde mit CCP4 durchgeführt (Leslie (1992), Acta Cryst. D50, 760-763; Joint CCP4 and ESF-EACMB, Newslett. Protein Crystallogr. (Daresburg Laboratory Warrington UK 26; Collaborative Computational Project Number 4 (1994)).

Eine bei 0,5 nm Auflösung berechnete Rotationsfunktion zeigte zwei mit der Kristallsymmetrie in Beziehung stehende Peaks, die auf das Vorhandensein von lokalen diadischen Molekülachsen bei ψ 86° ϕ 90° und ψ 94° ϕ 90° hinwiesen. Ihre Korrelationswerte waren die Hälfte des Wertes einer kristallographischen Diade, wie sie für eine fast ideale molekulare zweifache Symmetrie zu erwarten war. Das T.acidophilum Modell wurde für die Patterson Suchkalkulationen unter Verwendung von AMoRe (Navaza (1994), Acta Cryst. A50, 157-163) bei einer Auflösung von 0,35 nm eingesetzt. Diese zeigten, wenn man die D7 Symmetrie des Untersuchungsmodells in Betracht zog, eine einzige Lösung mit einem Korrelationswert von 0,32 und einem R-Faktor von 56,7 % verglichen mit dem nächsthöchsten Peak von 0,28 und 57 %.

Das T.acidophilum Modell wurde auf Polyalanin reduziert mit nur einigen wenigen konservierten Resten, die in der α -Typ Untereinheit verblieben. Dieses Modell ergab einen R-Faktor von 57,7 % und wurde zur Berechnung einer $2F_o - F_c$ Karte bei 0,24 nm mit X-PLOR (Bruenger (1992), X-PLOR Version 3.1. A System for X-Ray Crystallography and NMR) verwendet. Die elektronische Dichte wurde im Realraum mit MAIN (Turk (1992), Dissertation, Technische Universität München) unter Verwendung der lokalen Zweifachachse im gegenwärtigen Modell ($\psi=85,1$, $\phi=90,8$, $\kappa=180,1$) gemittelt, rücktransformiert, und eine neue Dichte wurde mit $2F_o - F_c$ Koeffizienten berechnet. Nach 10 Abgleichungszyklen war die Qualität der Karte gut ($R_{\text{back}}=27,3$ %). Die einzelnen Untereinheiten wurden entsprechend ihrer charakteristischen Insertionen, Deletionen und Aminosäuresequenzen identifiziert und wurden in die Karte auf einem ESV-30 Graphiksystem

Arbeitsstation (Evans & Sutherland, Salt Lake City, Utah) unter Verwendung von FRÖDO (Jones (1978), J. Appl. Cryst. 11, 268-272) eingebaut. Eine kristallographische Verfeinerung erfolgte mit X-PLOR (Bruenger, 1992) mit energetisch und zweifach nicht-kristallographischen Symmetriebeschränkungen unter Verwendung der von Engh und Huber (1991), Acta Cryst. A 47, 392 - 400, beschriebenen Parameter. Zusätzlich wurde zur Korrektur für eine anisotrope Kristallordnung ein Streuungsbeitrag für das Lösungsmittel berechnet und während der Verfeinerung in die Berechnung des Modells einbezogen.

Das fertige Modell berücksichtigt die Inhibitormoleküle Lactacystin und Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal, 18 Magnesiumionen, bzw. 1.800 Wassermoleküle. Die R-Werte sind zufriedenstellend und die Standardgeometrie der Bindungen und Winkel hervorragend. Die lokale molekulare diadische Symmetrie ist gut konserviert, was auch durch den sehr geringen Wert R_{back} 13 % in der Endstufe der Analyse gezeigt wird. Der Anstieg im R-Wert um 3 % für Daten mit einer Auflösung von 0,28 nm gegenüber 0,24 nm ist eine Folge der anisotropen Kristallordnung, welche die Datenqualität beeinträchtigt, und der beschränkten Einbeziehung geordneter Lösungsmittelmoleküle.

Beispiel 4 Charakterisierung der Struktur

25 4.1 Struktur von Untereinheiten

Die 14 aus Hefe klonierten Gene, die für Komponenten des 20S Proteasoms kodieren, können in sieben α -Typ und sieben β -Typ Untereinheiten eingeteilt werden.

30 Die β -Typ Untereinheiten werden als Prekursoren synthetisiert, die zu den im assemblierten Proteasom vorliegenden reifen Formen prozessiert werden. Die reifen β -Typ Polypeptide $\beta 2/\text{PUP1}$, $\beta 5/\text{PRE2}$ und $\beta 1/\text{PRE3}$ werden aus ihren Proformen durch Spaltung zwischen Gly-1 und Thr1 unter Freisetzung der aktiven Stelle Thr1 erhalten, während $\beta 7/\text{PRE4}$ zwischen Asn-9 und Thr-8 und $\beta 6/\text{C5}$ zwischen His-10 und Gln-9 gespalten werden und als sta-

bile Prozessierungsintermediate vorliegen. $\beta 4/C11$ und $\beta 3/PUP3$ werden nicht prozessiert und beginnen mit Met(-1) bzw. Met(-9). Die Untereinheiten PUP1, PRE2 und PRE3 werden als vollständig prozessiert, die Untereinheiten PRE4 und C5 als teilweise prozessiert und die Untereinheiten C11 und PUP3 als unprozessiert bezeichnet.

Alle 14 Untereinheiten liegen in der kristallinen molekularen Struktur an eindeutigen Positionen vor. Sie sind fast vollständig definiert durch die Elektronendichte abgesehen von einigen Kettentermini und langen Insertionssegmenten.

Die Elektronendichte für die Hauptketten ist in den α -Typ-Untereinheiten wie folgt definiert: $\alpha 2/Y7$: Thr5-Leu236, $\alpha 3/Y13$: Gly4-Gly237, $\alpha 4/PRE6$: Tyr8-Gln244, $\alpha 5/PUP2$: Arg10-Glu243 (7 Reste der Insertion sind nicht definiert - Gly12 bis Arg 126), $\alpha 6/PRE5$: Phe4 - Ile233, $\alpha 7/C1$: Gly5 - Asn241, $\alpha 1/C7$: Gly6 - Asp240.

In den β -Typ-Untereinheiten ist die Elektronendichte wie folgt definiert: $\beta 3/PUP3$: Ser-8-Asp193, $\beta 6/C5$: Gln9-Asp193, $\beta 4/C11$: Met-1-Gln192, $\beta 7/PRE4$: Thr-8-Ile211, $\beta 2/PUP1$: Thr1-Cys221, $\beta 1/PRE3$: Thr1-Leu196, $\beta 5/PRE2$: Thr1-Gly211.

Alle sieben α - und β -Typ-Polypeptide haben eine charakteristische β -Sandwich-Struktur. Sie ist gebildet aus zwei fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblattstrukturen mit den darüberliegenden helicalen Schichten aus den Helices H3, H4, H5 und den darunterliegenden Helices H1 und H2 gebildet. Sie unterscheiden sich aber in den Knicken, die um einen oder zwei Aminosäurereste in der Länge variieren, in langen Insertionen, die Sekundärstrukturelemente verbinden, sowie in den N-terminalen und insbesondere in den C-terminalen Regionen.

Bei den α -Typ-Untereinheiten hat $\alpha 2/Y7$ eine lange Insertionschleife zwischen den Strängen S9 und S10, die aus einer kurzen α -Helix und einem β -Strang aufgebaut ist. $\alpha 1/C7$ weist eine

Verlängerung der Helix H3 um zwei Knicke durch die Insertion bei G180 auf. Die Untereinheiten $\alpha 1/C7$, $\alpha 3/Y13$, $\alpha 4/PRE6$, $\alpha 5/PUP2$ und $\alpha 7/C1$ haben längere C-terminale Helices H5, die aus der Teilchenoberfläche in die Lösung hervorstehen. Die hochgeladenen, meist sauren C-terminalen Segmente sind unstrukturiert.

Bei den β -Typ-Untereinheiten mit langen Insertionen hat $\beta 7/PRE4$ einen deutlichen Knick zwischen den Helices H1 und H2 und eine zusätzliche α -Helix mit 2 Knicken bei Rest 145. $\beta 6/C5$ hat eine Insertion von 17 Resten zwischen H3 und H4 mit einer komplexen Faltung und einer kurzen Helix. $\beta 2/PUP1$ hat eine sehr lange C-terminale Extension, die in ihren letzten 11 Resten stark ungeordnet ist. Die Untereinheiten $\beta 3/PUP3$ und $\beta 6/C5$ haben kurze C-Termini, so daß die Helices H5 nicht existieren, und die Stränge S10 verlängert sind, um das β -Faltblatt zu vergrößern. In $\beta 4/C11$ existiert die Helix H5, ist aber um 2 Knicke kürzer als bei *T. acidophilum*.

Viele dieser Untereinheit-spezifischen Knicke, Insertionen und N- und C-Termini sind an Kontakten zwischen Untereinheiten beteiligt, wie im folgenden diskutiert wird.

4.2 Der (C7, Y7, Y13, PRE6, PUP2, PRE5, C1, PRE3, PUP1, PUP3, C11, PRE2, C5, PRE4) Komplex

Jede der sieben α -Typ-Untereinheiten hat zwei Nachbarn innerhalb des heptameren Rings, die α -cis-Wechselwirkungen aufweisen, und eine oder zwei in Nachbarschaft liegende β -Typ-Untereinheiten im anderen Ring mit α -trans- β -Wechselwirkungen. Die zentral lokalisierten β -Typ-Untereinheiten haben zusätzlich zu den β -cis und β -trans- α -Wechselwirkungen eine oder zwei in Nachbarschaft liegende β -Typ Untereinheiten im anderen β -Ring mit β -trans- β -Wechselwirkungen.

Die generelle Architektur der Quartärstruktur ist im Proteasom von *T. acidophilum* und Hefe gleich (Fig. 2): Das N-terminale

Schleifensegment, Helix H0 (Reste 20 bis 30), Schleife L, die H2 und S5 verbindende Schleife und der Strang S7 vermitteln α -cis-Wechselwirkungen. Die β -cis-Kontakte, die weniger eng zu sein scheinen, umfassen die Schleife L, das N-Ende der Helix H1, den Strang S7 und den den Strang S8 und die Helix H3 verbindenden Knick. Diese Kontakte stammen aus dem D7-symmetrischen Vorläufer und finden sich auch im T.acidophilum Proteasom. Trotz der konservierten Architektur sind diese Kontakte aufgrund ihrer spezifischen Aminosäuresequenzen für die jeweiligen Untereinheiten spezifisch.

Es gibt viele zusätzliche Kontakte, die in T.acidophilum fehlen, und durch Sequenzen und Sequenzinsertionen bewirkt werden, die für Hefe und Eukaryonten im allgemeinen charakteristisch sind. Innerhalb der α -Ringe werden enge α -cis-Kontakte durch die verschlungenen N-Termini der Untereinheiten $\alpha 1/C7$, $\alpha 2/Y7$, $\alpha 3/Y13$ und $\alpha 7/C1$ im Zentrum des heptameren Rings hergestellt. Das in allen Untereinheiten konservierte Tyr8 spielt eine zentrale Rolle. Innerhalb der β -Ringe existiert ein sehr spezifischer Kontakt zwischen $\beta 2/PUP1$ und $\beta 3/PUP3$, der durch den langen C-terminalen Arm von PUP1 vermittelt wird, der PUP3 umfaßt und fast den übernächsten Nachbarn $\beta 4/C11$ berührt. β -trans- α -Kontakte erfolgen durch die Helix H1-Schleife-Helix H2 Motive, welche mit den gleichen Motiven von zwei benachbarten α -Untereinheiten wechselwirken. Dieses grundlegende Kontaktmotiv war auch in der T.acidophilum Struktur zu sehen (siehe Figur 4a bei Löwe et al. (1995), Science 268, 3479-3486), aber die Insertion bei Rest 66 von $\beta 7/PRE4$ begünstigt dessen Assoziierung mit $\alpha 6/PRE5$ und $\alpha 7/C1$. In ähnlicher Weise bindet die lange Insertion in $\alpha 2/Y7$ bei Rest 210 zwischen den Strängen S9 und S10 an $\beta 2/PUP1$ und koppelt dieses Paar. Spezifische β -trans- β -Wechselwirkungen werden durch den C-terminalen Arm von $\beta 7/PRE4$ gebildet, der zwischen $\beta 2'/PUP1$ und $\beta 1'/PRE3$ eingelagert ist. Das C-terminale Segment von $\beta 5/PRE2$ wechselwirkt mit $\beta 3'/PUP3$ und $\beta 4'/C11$ auf ähnliche Weise (Figur 3). Die lange Insertion von $\beta 6/C5$ am Rest 145 kontaktiert Untereinheit $\beta 3'/PUP3$ und den C-terminalen Arm von $\beta 2'/PUP1$.

Sehr spezifische β -trans- β -Wechselwirkungen werden durch Magnesiumionen vermittelt: Magnesium Y8 verbrückt das Hauptket-
tencarboxylat von Asp193 aus $\beta 6/C5$ mit der Schleife 162 bis
167 von $\beta 2'/PUP1$. Auf gleiche Weise verbrückt das Magnesium Y9
5 die Untereinheit $\beta 3/PUP3$ über Asp193 mit $\beta 5'/PRE3$. Darüber hi-
naus sind diese Carboxylatgruppen-Liganden für andere Magne-
siumionen, die in den Schleifen 165 von $\beta 4/PUP3$ (Magnesium W6)
bzw. $\beta 6/C5$ (Magnesium W4) lokalisiert sind und die eine Rolle
in der Stabilisierung der Untereinheitenstruktur spielen kön-
10 nen. Die Aspartatreste sind vollständig verdeckt und ihre
Seitenketten an Ladung-Ladung-Wechselwirkungen mit Arg 19 von
 $\beta 2'/PUP1$ bzw. Arg 19 von $\beta 5'/PRE2$ beteiligt, wodurch die β -
trans- β -Kontakte weiter verstärkt werden. Die β -Typ Unterein-
heiten $\beta 1/PRE3$ und $\beta 4/C11$ liegen an der einzigen Moleküldiade
15 des Hefeproteasoms und sind sehr ähnlich dem dominanten β -
trans- β -Kontakt an den Resten 133-137 der Helix H3 von T.aci-
dophilum.

18 Magnesiumpositionen wurden im Proteasommolekül identifi-
20 ziert, von denen 12 auf den Innenwänden der β - β -Kammer lokali-
siert sind und die im Folgenden diskutierte saure Natur dieses
Kompartments belegen. Es ist erkennbar, daß die Vielzahl spe-
zifischer Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten deren
spezifische und eindeutige Positionen innerhalb des Proteasoms
25 bestimmt.

4.3 Die N-terminale Threoninposition

Im T.acidophilum Proteasom wurde durch Struktur- und Muta-
30 tionsuntersuchungen ein katalytisches System mit Thr1, Glu17
und Lys33 definiert (Löwe et al. (1995), supra und Seemüller
et al. (1995), Science 268, 579-582).

Nahe an Thr 1 befinden sich die Reste Ser129, Ser169 und
35 Asp166, die für die strukturelle Integrität dieser Stelle
erforderlich sind, aber auch an der Katalyse beteiligt sein
könnten. Durch Mutagenese wurde gezeigt, daß Asp166 im Protea-

som von *T. acidophilum* essentiell ist (Seemüller et al. (1996), Nature 382, 468-470). Diese Reste sind in den aktiven Untereinheiten PUP1, PRE2 und PRE3 invariant.

5 Zusätzlich wurde ein vollständig gebundenes Lösungsmittelmolekül NUK in allen drei Untereinheiten nahe bei Thr10^Y und N, Ser1290^Y und N und Gly47N gefunden, wie exemplarisch für die Untereinheit β 5/PRE2 im Lactacystin-Komplex (Figur 4) gezeigt ist. Dies wurde bei einer geringeren Auflösung im Modell von
10 *T. acidophilum* nicht erkannt. Thr1N hat Wasserstoffbrücken zu Ser1680 und O^Y und Ser1290^Y. Thr10^Y hat eine Wasserstoffbrücke zu Lys33^I. Asp17 hat Wasserstoffbrücken über O⁶¹ zu Arg19N und Gly170N und über O⁶² zu Thr/Ser2N und Lys33N^I. Auf ähnliche Weise hat Lys33N^I drei Wasserstoffbrücken zu Asp170⁶², Arg190
15 und Thr10^Y.

Das Muster von Wasserstoffbrücken läßt vermuten, daß sowohl Asp17 als auch Lys33 geladen sind. Thr1N kann eine Wasserstoffbrücke zu ThrO^Y ausbilden und ist vermutlich neutral, ein
20 Zustand der durch einen nahegelegenen positiv geladenen Lysinrest begünstigt wird. Eine solche Ladungsverteilung wäre auch aufgrund der jeweiligen Standard-pKa-Werte zu erwarten. Thr1N ist daher höchswahrscheinlich der Protonenakzeptor, wenn Thr10^Y an einem elektrophilem Zentrum beteiligt ist. Dies wird durch
25 die Struktur des Lactacystinkomplexes bestätigt, der einen Ester zwischen Lactacystin und Thr1 als Ergebnis einer β -Lacton-Ringöffnung nach einem nukleophilen Angriff durch Thr10^Y aufweist. Thr1N ist genau an der Position, um als Protonenhuttle von Thr10^Y zum Lactacystin-O6 zu dienen. Eine analoge
30 Reaktionssequenz wird für die Hydrolyse des C-terminalen Fluorophoren von fluorogenen Substraten vorgeschlagen, wobei der Protonentransfer im Amidstickstoff der Abgangsgruppe erfolgt. Das erzeugte Acyl-Enzym wird, wie in den Abschnitten D-E von Figur 5 gezeigt, durch das Wasser NUK deacyliert. Alternativ
35 oder parallel könnte ein direkter Angriff von NUK auf die Peptidbindung erfolgen, wobei das Intermediat I umgangen wird.

4.4 Inhibitorbindung

β 3/PUP1, β 1/PRE3 und β 5/PRE2 haben den Inhibitor Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal kovalent an Thr10' vermutlich als Hemiacetal gebunden. Er nimmt eine β -Konformation an und füllt die Lücke zwischen Strängen, welche die Reste 20 und 21 bzw. 47 enthalten (der Schleife L in Figur 3 bei Löwe et al., 1995, supra, zugeordnet), an die er über Wasserstoffbrücken gebunden ist, wodurch eine antiparallele β -Faltblattstruktur erzeugt wird. Die Norleucinseitenkette reicht in eine Tasche (die S1-Tasche) hinein, die seitlich zu einem Tunnel hin offen ist, der zur Partikeloberfläche führt. Die Leucinseitenkette bei P2 ist nicht in Kontakt mit Protein und die Leucinseitenkette bei P3 ist in Kontakt mit der benachbarten β -Untereinheit. Die S1-Spezifitätstasche wird hauptsächlich durch die Reste 20, 31, 35, 49, 53 gebildet, d. h. Ala20, Val31, Ile35, Met45, Ala49, Gln53 (K) in β 5/PRE2 (Fig. 6c), Thr20, Thr31, Thr35, Arg45, Ala49, Gln53 in β 1/PRE3 (Fig. 6a), Ser20, Cys31, His35, Gly45, Ala49, Glu53 in β 2/PUP1 (Fig. 6b). Der Rest 45 formt den Boden der Tasche und scheint weitgehend ihren Charakter zu bestimmen. Benachbarte Untereinheiten in den β -Ringern tragen weiter zu den S1-Taschen bei und modulieren deren Charakter: β 2/PUP1 im Falle von β 1/PRE3 mit His114, His116, Ser118, Asp120; β 3/PUP3 im Falle von β 2/PUP1 mit den Resten Asp114, Asp120 und Cis118 und β 6/C5 im Falle von β 5/PRE2 mit Ser118, Asp114, Glu120 und Glu122.

Lactacystin ist kovalent an β 5/PRE2 gebunden. Dies steht im Einklang mit der beobachteten chemischen Modifizierung von Untereinheit X des Säugerproteasoms (Fenteany et al., (1995), Science 268, 726-730) dem Homolog von PRE2. Seine Dimethylseitenkette bei C10 reicht wie eine Valin- oder Leucinseitenkette in S1 hinein, aber weniger tief als die Norleucinseitenkette von Calpain. Lactacystin bildet mehrere Wasserstoffbrücken mit Atomen der Proteinhauptkette LactN-Gly47O, LactO4'-Gly47N, LactO9'-Thr21N, LactO6'-Thr1N. Da diese zuletzt genannten Wechselwirkungen auch in β 2/PUP1 und β 1/PRE3 auftreten könn-

ten, die keine kovalenten Komplexe mit Lactacystin bilden, scheint die S1 Seitengruppe, die in der hydrophoben S1 Tasche von $\beta 5$ /PRE2 bindet, die Ausbildung einer kovalenten Bindung und deren Stabilisierung zu dirigieren. somit ist diese Seitengruppe ein wichtiger Ansatzpunkt zur Entwicklung von Inhibitoren.

4.5. Spezifität

10 $\beta 5$ /PRE2 hat einen Methioninrest an Position 45 in Kontakt mit der verzweigten Seitenkette von Lactacystin im Komplex. Im Calpain-Inhibitorkomplex drückt die Norleucinseitenkette von Calpain die Methioninseitenkette um bis 0,27 nm in Richtung auf Ile35, das aus dem Weg rotiert. Diese konzentrierten Bewegungen machen die S1 Tasche geräumiger. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, daß Lactacystin die chymotryptische Aktivität gegenüber chromogenen Substraten hemmt. Auf ähnliche Weise wird die chymotryptische Aktivität in Proteasomen mit einer $\beta 5$ /PRE2 Mutante, die nicht aus ihrer Proform prozessiert werden kann (Chen & Hochstrasser (1996), Cell 86 961-972) und durch eine Mutation in $\beta 5$ /PRE2 verringert, wo eine Substitution von Ala49 durch Val in der S1 Tasche die Größe beschränkt (Heinemeyer et al. (1993), J. Biol. Chem. 268, 5115-5120). $\beta 1$ /PRE3 hat einen Argininrest in Position 45 am Boden der S1 Tasche, die gut für Glutamat P1 Reste geeignet ist. Sie ist am wahrscheinlichsten die mit der Peptidylglutamyl-Peptid-Hydrolyseaktivität (PGPH) des Proteasoms assoziierte Untereinheit. Jedoch auch die Norleucinseitenkette besetzt diese basische Tasche im Calpaininhibitorkomplex. Es wurde eine hoher zusätzlicher Dichtepeak beobachtet, der mit der Guanidiniumseitenkette assoziiert ist und als Chlorid- oder Carbonation interpretiert werden kann, welches eine nicht ausgeglichene positive Ladung kompensiert. $\beta 2$ /PUP1 hat als Rest 45 ein Glycin und folglich eine geräumige, am Boden durch His35 und Glu53 begrenzte S1 Tasche.

Wir folgern, daß $\beta 5/\text{PRE}2$ sowohl die chymotryptische als auch die tryptische Aktivität enthält, während $\beta 1/\text{PRE}3$ die PGPH-Aktivität enthält, aber beide Taschen sind hinsichtlich der Größe ($\text{PRE}2$) und der Polarität ($\text{PRE}3$) anpassungsfähig. $\beta 2/\text{PUP}1$ ist für sehr große P1 Reste mit basischem Charakter geeignet. Mutationsanalysen haben gezeigt, daß Substitutionen in $\beta 4/\text{C}11$ und $\beta 7/\text{PRE}4$ die chymotrypsinartige bzw. die PGPH Aktivität beeinflussen (Heinemeyer et al. (1993), supra; Hilt & Wolf (1996), TIBS 21, 96-102; Hilt et al. (1993), J. Biol. Chem. 268, 3479-3486). Diese Untereinheiten sind inaktiv, aber in Nachbarschaft zu den Untereinheiten $\beta 5/\text{PRE}2$ und $\beta 1/\text{PRE}3$ aus beiden Ringen gelegt (Figur 4). Der Austausch von Ser136 durch das voluminöse Phe in $\beta 4/\text{C}11$ stört den β -trans- β -Kontakt an Helix H3 zwischen $\beta 4/\text{C}11$ und $\beta 5/\text{PRE}2$ und kann die benachbarte Thr1 Stelle stören, wie auch vermutlich die Deletion der 15 C-terminalen Reste von $\beta 7/\text{PRE}4$, die extensive Kontakte mit $\beta 1/\text{PRE}3$ bilden (Fig. 3).

4.6 Propeptide und Prozessierung

Fünf β -Typ-Untereinheiten werden mit Propeptiden unterschiedlicher Längen bis zu 75 Aminosäuren synthetisiert, die während der Reifung abgespalten werden. $\beta 2/\text{PUP}1$, $\beta 5/\text{PRE}2$ und $\beta 1/\text{PRE}3$ zeigen eine Autolyse zwischen Gly-1 - Thr1. Dies ist ein Prozeß, für den das Vorhandensein von Thr1, Gly-1 und Lys33 erforderlich ist. Wir hatten bereits eine Autolyse innerhalb der Untereinheit vorgeschlagen, wobei Thr10' als Nukleophil die vorangehende Peptidbindung angreift (Schmidtke et al. (1996), EMBOJ. 15, 6887-6898).

Gemäß der Kristallstruktur wird dem Wasser NUK eine zentrale Rolle zugeordnet. Es ist idealerweise so positioniert, um als Base bei der Entfernung eines Protons von Thr10' zu wirken und die nukleophile Addition an den Carbonylkohlenstoff von Gly-1 anzutreiben. Es gibt keine Informationen über die Position und Orientierung der Gly-1-Thr1-Peptidgruppe in den vollständig prozessierten Untereinheiten, aber wir können sie von teil-

weise prozessierten oder unprozessierten Untereinheiten $\beta 3/\text{PUP3}$, $\beta 6/\text{C5}$ und $\beta 7/\text{PRE4}$ ableiten, welche ähnliche Orientierungen zeigen. Gly-10 ist in diesen Untereinheiten in Richtung des positiv geladenen Lys33N⁺ und von Gly47N⁺ gerichtet, die ein Sauerstoffanionenloch in Analogie zu Serinproteasen bilden, um die entstehende negative Ladung zu verteilen, wenn das tetraedrische Addukt gebildet wird. Eine Umlagerung zum Ester kann nach dem Protonentransfer vom Wasser NUK zu Thr1N und Spaltung der Peptidbindung erfolgen. Die nahegelegenen Reste Ser1290⁺ und Ser1690⁺ unterstützen diese Reaktion. Beide Hydroxylgruppen sind über Wasserstoffbrücken an Asp166 gebunden, welches in den aktiven Untereinheiten invariant ist. NUK ist wahrscheinlich ebenfalls bei der Esterhydrolyse als angreifendes Nukleophil beteiligt, welches schließlich in das Produkt eingebaut wird (Fig. 5, Abschnitte a bis c). Der Gly-1 Rest scheint essentiell zu sein, da eine Seitenkette an Position -1 mit dem Proteinerückgrat bei Position 168 interferieren und eine Konfiguration erzwingen würde, die für eine Autolyse ungeeignet ist.

Mit Freisetzung von Thr1 werden die Untereinheiten aktiv. Wenn die katalytische Stelle nicht intakt ist, wie in den Untereinheiten $\beta 3/\text{PUP3}$, $\beta 6/\text{C5}$ und $\beta 4/\text{C11}$, denen Thr1 fehlt, in $\beta 7/\text{PRE4}$, bei dem Lys33 durch Arg ersetzt ist, und in konstruierten Varianten von LMP2, dem Säugerhomolog von $\beta 1/\text{PRE3}$ (Schmidtke et al. (1996), supra) und von PRE2 (Chen & Hochstrasser (1996), supra) tritt eine Autolyse bei Rest 1 nicht auf. $\beta 7/\text{PRE4}$ besitzt beide essentiellen Reste Gly-1 und Thr1, aber in einer Konfiguration, die sich stark von derjenigen unterscheidet, die in den aktiven Untereinheiten gefunden wird, da die Thr1 Seitenkette durch das größere Arg33 weggedrückt wird, welches den Lysinrest ersetzt (Figur 4b). Das Auffinden von Defekten in der katalytischen Aktivität und in der Prozessierung belegt die strukturelle Labilität der Thr1-Stelle, die durch Mutationen von benachbarten Resten der gleichen oder benachbarten Untereinheiten gestört werden kann. Andererseits ist es auch möglich, daß eine inaktive Mutante in

der Umgebung aktiver Untereinheiten selbst aktiv werden kann, was im Einklang mit Beobachtungen steht, daß *T. acidophilum* Spezies, die einen Defekt in der Prozessierung aufweisen, bei Koexpression mit Wild-Typ-Protein prozessiert werden (Seemüller et al. (1996), supra).

Die Propeptide spielen eine essentielle Rolle bei der Assemblierung eukaryontischer Proteasomen, was auf direkte oder indirekte Effekte durch Teilnahme an Wechselwirkungen zwischen Untereinheiten und/oder durch Stabilisierung der Struktur von Untereinheiten zurückzuführen sein kann. Die beobachteten Strukturen der Prozessierungsintermediate von $\beta 7$ /PRE4(M) und $\beta 6$ /C5 und des unprozessierten Propeptids $\beta 3$ /PUP3 geben Hinweise darauf, daß beide Effekte auftreten, da die Propeptide fest an den Rest des Proteins gebunden sind und mit anderen Untereinheiten wechselwirken, z. B. Propeptid $\beta 7$ /PRE4 mit $\beta 1$ /PRE3 bei den Resten 92 und 115 und Propeptid $\beta 6$ /C5 mit $\beta 7$ /PRE4 bei 91 und 116.

20 4.7 Eintritt in das und Austritt aus dem Proteasompartikel

Die hydrolytische Aktivität des Proteasoms ist mit Thr1 und der β -Ringflächen im Inneren des die hydrolytische Kammer definierenden β -Hohlraums assoziiert. Das Substrat muß in das Partikel eindringen und das Produkt muß freigesetzt werden. Beim Proteasom von *T. acidophilum* sind zwei Eintrittsöffnungen mit einem Durchmesser von etwa 1,3 nm an den Enden der zylindrischen Teilchen offen, die durch eine Ringfläche von Knickbildenden Segmenten Tyr126-Gly-Gly-Val der sieben identischen α -Untereinheiten begrenzt sind. Die N-terminalen Reste 1 bis 12 sind in diesem Protein ungeordnet.

Im Gegensatz dazu ist die hydrolytische Kammer des 20S Proteasoms der Hefe fast unzugänglich. Die N-Termini der Untereinheiten $\alpha 1$ /C7, $\alpha 2$ /Y7, $\alpha 3$ /Y13, $\alpha 6$ /PRE5 und $\alpha 7$ /C1 reichen in die Öffnung hinein und füllen sie vollständig mit mehreren Schichten von eng miteinander verwobenen Seitenketten aus (Figur 8).

Es gibt somit keinen Zugang in das Innere des Partikels von den Zylinderenden ohne erhebliche Umlagerung. Es gibt einige enge Seitenfenster, insbesondere an der Grenzfläche zwischen den α - und β -Ringern, die durchlässiger sind als im T.acidophilum Proteasom, da kleinere Seitenketten dort vorliegen. Diese Öffnungen befinden sich hauptsächlich zwischen den zahnartigen Helix H1-Knick-Helix H2-Motiven der α - β -Grenzfläche (siehe Figur 4a bei Löwe et al. (1995), supra) und führen zu den N-terminalen Threoninresten des aktiven Zentrums. Sie sind mit polaren und geladenen Aminosäuresseitenketten bedeckt, die sich bewegen können, um Öffnungen mit etwa 1 nm Durchmesser zu erzeugen und möglicherweise die Passage von ungefalteten gestreckten Polypeptidketten erlauben. Das 19S Partikel, welches die ATP- und Ubitiquin-Abhängigkeit der Proteolyse durch das Proteasom bewirkt, ist an die Partikel angeheftet um das 26S Proteasom zu bilden. Die Assoziierung führt zu einer starken Aktivierung der Peptidhydrolyse (Hoffman und Rechsteiner (1994), J. Biol. Chem. 269, 1690-16895). Auf ähnliche Weise ist der Proteasomregulator PA28 an α -Typ Untereinheiten gebunden (Kania et al. (1996), Euro. J. Biochem. 236, 510-516). Er beschleunigt die Peptidspaltung und verbessert die Antigenprozessierung. Beide regulatorischen Faktoren könnten die Eingangsöffnungen auf kontrollierte Weise in vivo öffnen.

25 4.8 Erzeugung von MHC Klasse I Peptiden

Das 20S Proteasom erzeugt Peptidprodukte mit einer engen Längenverteilung, überwiegend Octa- oder Nonapeptide, ein Größenbereich, der optimal für die Bindung von MHC Klasse I Molekülen ist (York & Rock (1996), Annu. Rev. Immunol. 14, 369-396). In vitro Untersuchungen haben gezeigt, daß durch 20S Proteasomen aus intakten Proteinen erzeugte Peptide durch MHC Klasse I Moleküle präsentiert werden (Dick et al. (1994) Immunol. 152, 3884-3894; Niedermann et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8572-8577). In einem in vivo Experiment wurde gezeigt, daß Proteasomeninhibitoren die MHC Klasse I Präsentation von Proteinantigenen hemmen (Rock et al. (1994), Cell 78, 761-771)

und daß die Anzahl der an der Zelloberfläche vorliegenden MHC Klasse I Moleküle durch die induzierbaren Proteasomenuntereinheiten $\beta 5i/LMP7$ und $\beta 1i/LMP2$ reguliert wird, wie in Mäusen mit zielgerichteten Deletionen der für diese Proteine codierenden Gene gezeigt wurde (Fehling et al. (1994), Science 265, 1234-1237). LMP2 und LMP7 ersetzen nach IFN- γ Stimulierung die konstitutiv exprimierten Untereinheiten.

MHC Klasse I Peptide haben üblicherweise basische oder hydrophobe C-terminale Reste (siehe den Übersichtsartikel von Engelhard (1994), Curr. Opin. Immunol. 6, 13-23). Die LMP2/7 Substitution ändert vermutlich die Verteilung von Peptiden, so daß ein größerer Anteil der von MHC Klasse I Molekülen bevorzugten Peptiden erzeugt wird. LMP2 ersetzt Y, das humane Homologe von $\beta 1/PRE3$, LMP7 ersetzt X, das Homologe von $\beta 5/PRE2$. Alle Mitglieder dieser Unterfamilie zeigen einen hohen Grad an Sequenzidentität, aber $\beta 1i/LMP2$ hat zwei auffällige Unterschiede gegenüber $\beta 1/PRE3$ in der S1 Tasche: Thr31 \rightarrow Phe und Arg45 \rightarrow Leu. Durch den Austausch von Arg gegen Leu wird die Tasche unpolar und durch den Austausch von Thr gegen Phe enger, so daß die PGPH-Aktivität verringert und die chymotryptische Aktivität erhöht werden sollte, wenn $\beta 1i/LMP2$ das Säugerhomolog für $\beta 1/PRE3$ ersetzt. Dies wird in der Tat beobachtet (Gaczynska et al. (1993), Nature 365, 264-267; Driscoll et al. (1993), Nature 365, 262-264) wenn LMPs durch eine Behandlung mit IFN- γ induziert werden. Die gegenteilige Wirkung findet man in Zelllinien, denen die LMP2 und LMP7 Gene fehlen und in Mutantenmäusen mit einer Disruption des LMP2 Gens (Van Kaer et al. (1994), Immunity 1, 533-541). Ein Ersetzen der Säugerhomologen von $\beta 5/PRE2$ und $\beta 2/PUP1$ durch LMP7 bzw. MECL1 beeinflusst nicht direkt die S1 Taschen und ihre Effekte können nicht von einer Änderung der Spezifität bei P1 stammen, wie man sie für LPM2 findet.

Im Hefe 20S Proteasom werden die Untereinheiten $\beta 7/PRE4$ bzw. $\beta 6/C5$ an den Resten -8 und -9 teilweise prozessiert. Dabei entstehen Octa- oder Nonapeptidprodukte, die nicht aus dem

Enzym freigesetzt werden. Beide Peptide haben ähnliche Konformationen mit einer Verdickung, die zwei Abschnitte mit langgestreckter Konformation unterteilt, was der Konformation von MHC Klasse I-gebundenen Peptiden ähnelt. Durch Vergleich des Propeptids von $\beta 6/C5$ mit einem viralen Peptidnonamer im Komplex mit seinem MHC Klasse I Rezeptor (Madden et al. (1992), Nature 321-325) wird die Ähnlichkeit mit rms Abweichungen für alle Atome von 0,23 nm und für die C^α -Atome von 0,13 nm quantifiziert und läßt vermuten, daß bevorzugte lokale Konformationen eine Rolle bei der Erzeugung (durch das Proteasom) und Präsentation (durch MHC Klasse I Moleküle) von immundominanten Peptidepitopen spielen.

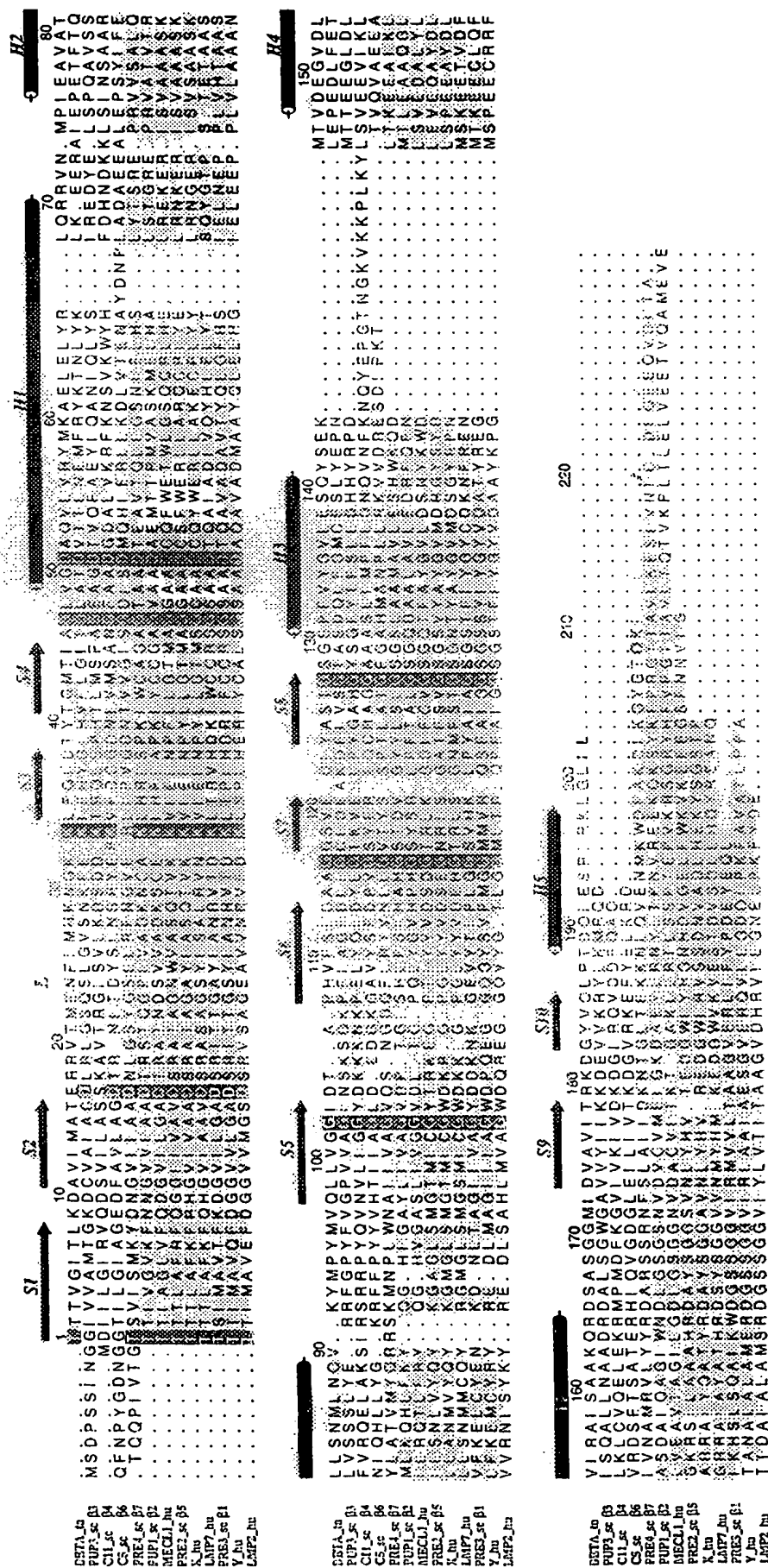
Ansprüche

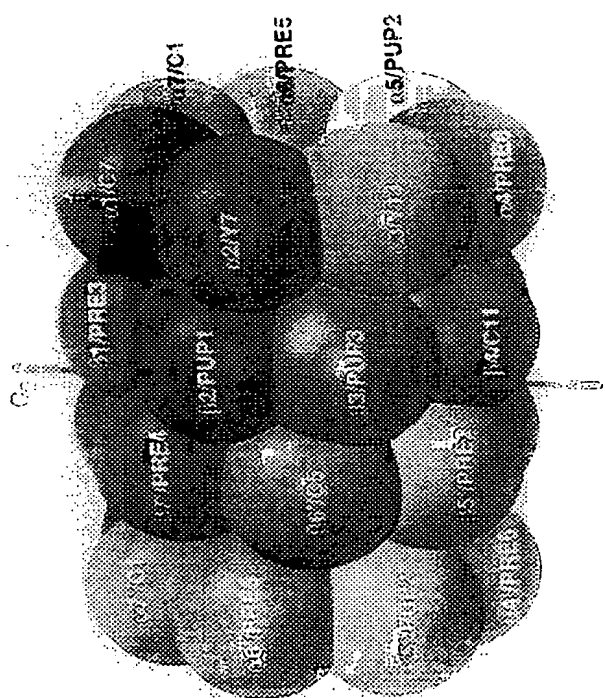
1. Verfahren zum Gewinnen einer aufgereinigten eukaryontischen Proteasomenpräparation, umfassend die Schritte:
 - (a) Herstellung eines Rohextrakts durch Aufschluß von eukaryontischen Zellen,
 - (b) Abtrennung unlöslicher Bestandteile aus dem Rohextrakt,
 - (c) chromatographische Auftrennung in Fraktionen über ein Ionenaustauschermedium,
 - (d) Testen der in Schritt (c) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen,
 - (e) chromatographische Auftrennung über Hydroxyapatit,
 - (f) Testen der in Schritt (e) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen,
 - (g) Konzentrierung der vereinigten Fraktionen,
 - (h) chromatographische Auftrennung über ein Gelfiltrationsmedium und
 - (i) Testen der in Schritt (h) erhaltenen Fraktionen und Sammeln der aktiven Fraktionen.
2. Verfahren nach Anspruch 1
dadurch gekennzeichnet,
daß man Hefezellen verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Testen der Fraktionen in Schritt (d), (f) oder/und (i) jeweils zwei Bestimmungen der proteolytischen Aktivität umfaßt, wobei eine in Abwesenheit und die andere in Gegenwart eines Proteasomeninhibitors durchgeführt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Lactacystin als Proteasomeninhibitor verwendet.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens einer der chromatographischen
Trennschritte in einem FPLC-System durchgeführt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
weiterhin umfassend das Kristallisieren der aufgereinig-
ten Proteasomenpräparation.
7. Aufgereinigte eukaryontische Proteasomenpräparation,
erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1
bis 5.
8. Aufgereinigte eukaryontische Proteasomenpräparation in
kristallisierbarer Form.
9. Aufgereinigte kristallisierte eukaryontische Proteasomen-
präparation.
10. Präparation nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Kristall einen Proteasomeninhibitor enthält.
11. Präparation nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Inhibitor ein Tripeptid-Aldehyd oder Lactacystin
ist.
12. Präparation nach einem der Ansprüche 7 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie ein Proteasom aus einer Hefe umfaßt.
13. Präparation nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie ein Proteasom aus *Saccharomyces cerevisiae* um-
faßt.

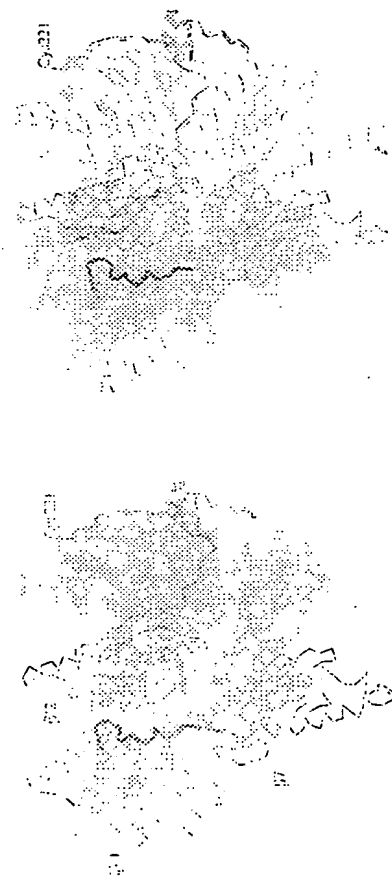
14. Präparation nach einem der Ansprüche 7 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen Komplex aus 28 Untereinheiten umfaßt, der
jeweils 2 Moleküle von 7 verschiedenen α -Typ-Unterein-
heiten und 7 verschiedenen β -Typ-Untereinheiten enthält.
15. Verwendung der aufgereinigten eukaryontischen Proteaso-
menpräparation nach einem der Ansprüche 7 bis 14 zur
Identifizierung und Gewinnung neuer Proteasomeninhibito-
ren.
16. Verwendung von Daten aus der Kristallstruktur von kri-
stallisierten eukaryontischen Proteasomenpräparationen
nach einem der Ansprüche 9 bis 14 zur Identifizierung und
Gewinnung neuer Proteasomeninhibitoren.
17. Verwendung von Kristallstrukturdaten aus dem Bereich der
Proteasomentaschen S1 der Untereinheiten β 1/PRE2, β 2/PUP2
oder/und β 5/PRE2 zur Identifizierung und Gewinnung neuer
Proteasomeninhibitoren.
18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17 in einem
computergestützten Modellprogramm.
19. Verwendung nach Anspruch 18, umfassend einen Schritt des
Homologiemodelling, indem die Kristallstrukturdaten eines
Hefeproteasoms mit Aminosäuresequenzen aus dem humanen
Proteasom modifiziert werden.
20. Neuer Proteasomeninhibitor,
dadurch gekennzeichnet,
daß er eine zur Proteasomentasche S1 der Untereinheiten
 β 1/PRE3, β 2/PUP2 oder/und β 5/PRE2 komplementäre dreidi-
mensionale Struktur aufweist.

Figur 1

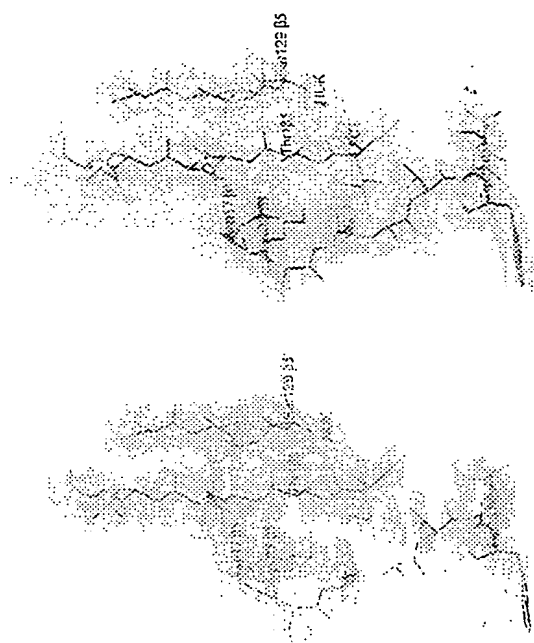




Figur 2

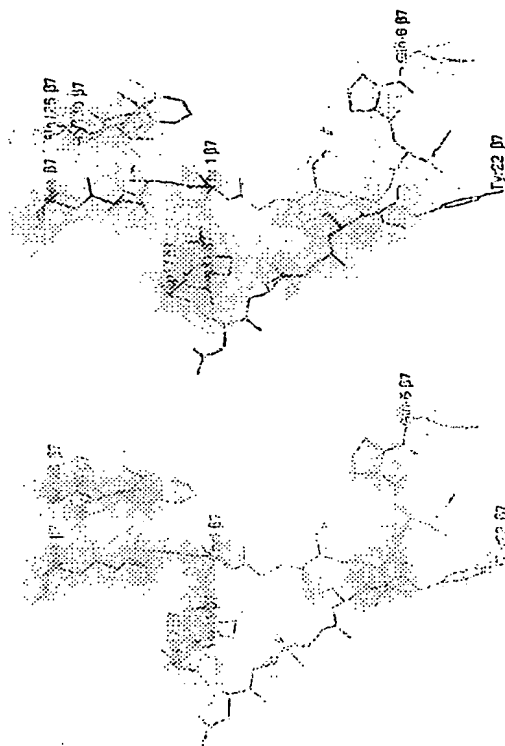


Figur 3



line map

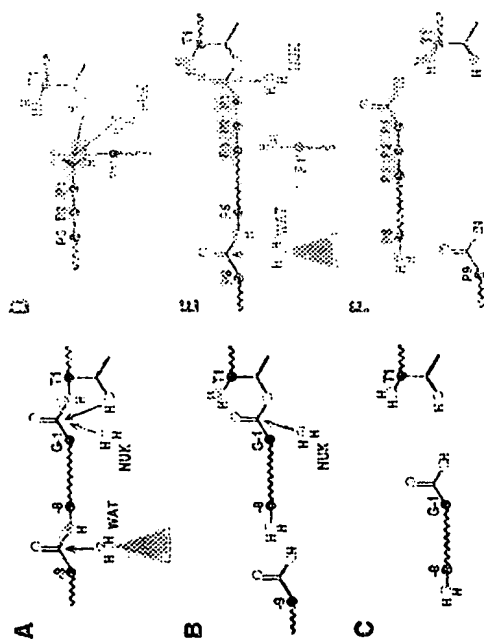
Figur 4a



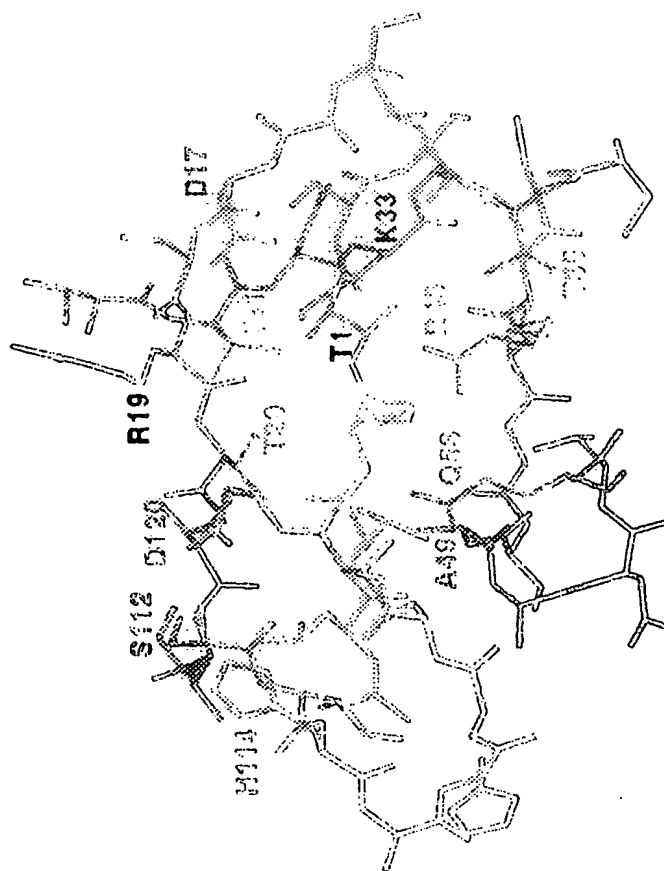
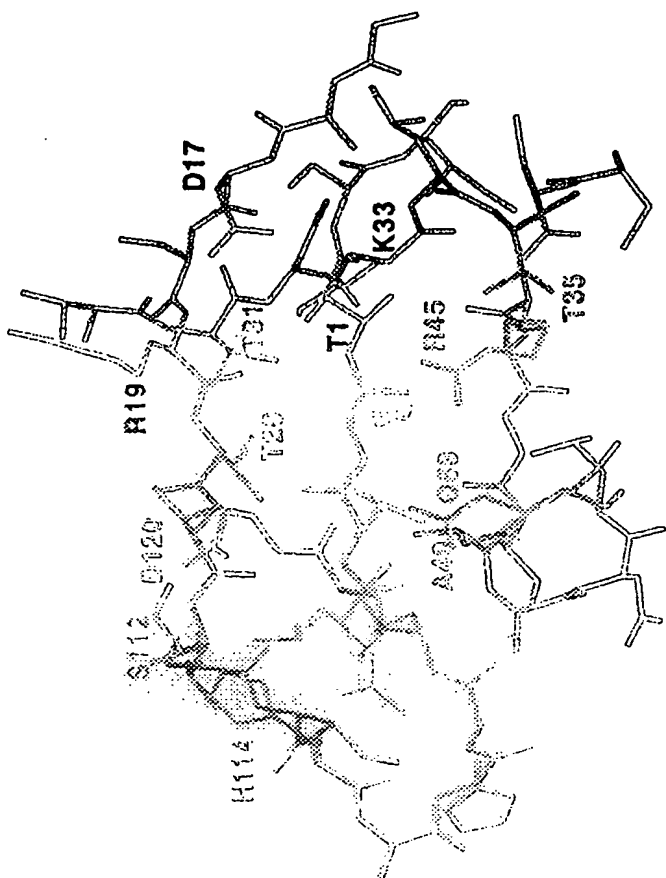
pre-may2

Figur 4b

Figure 5



7/11



Figur 6a

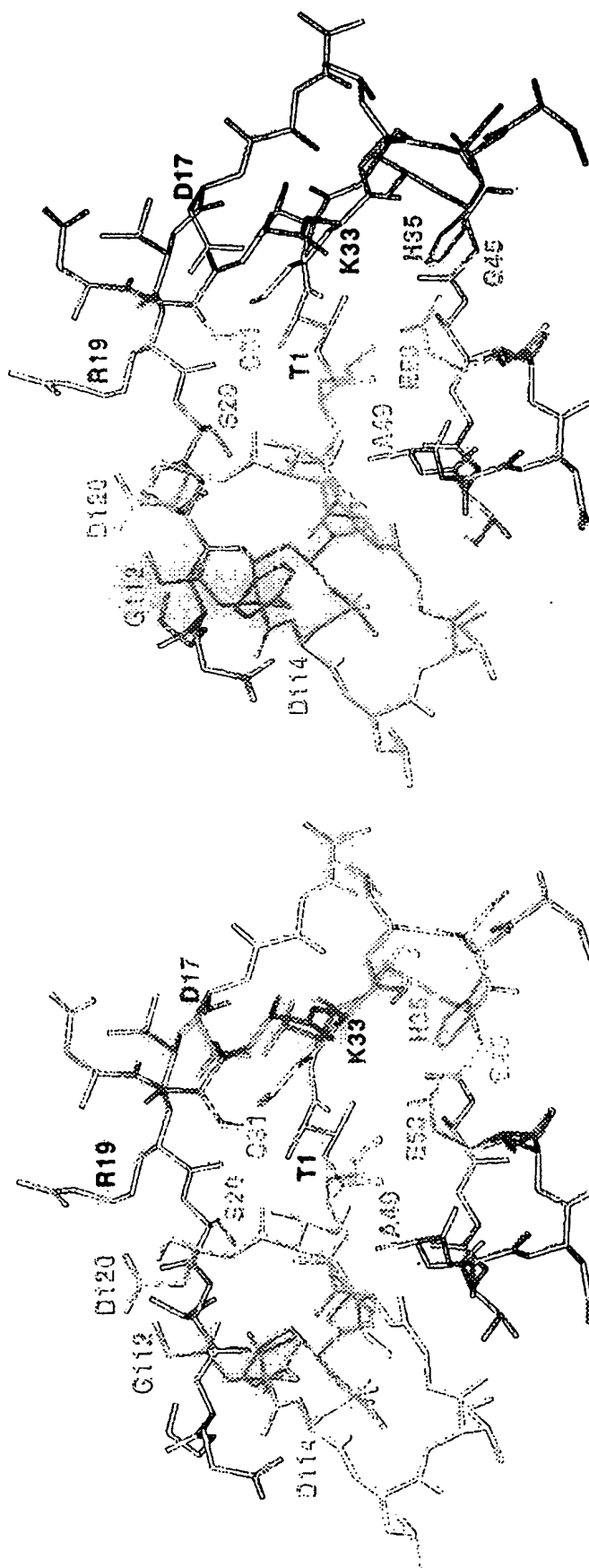
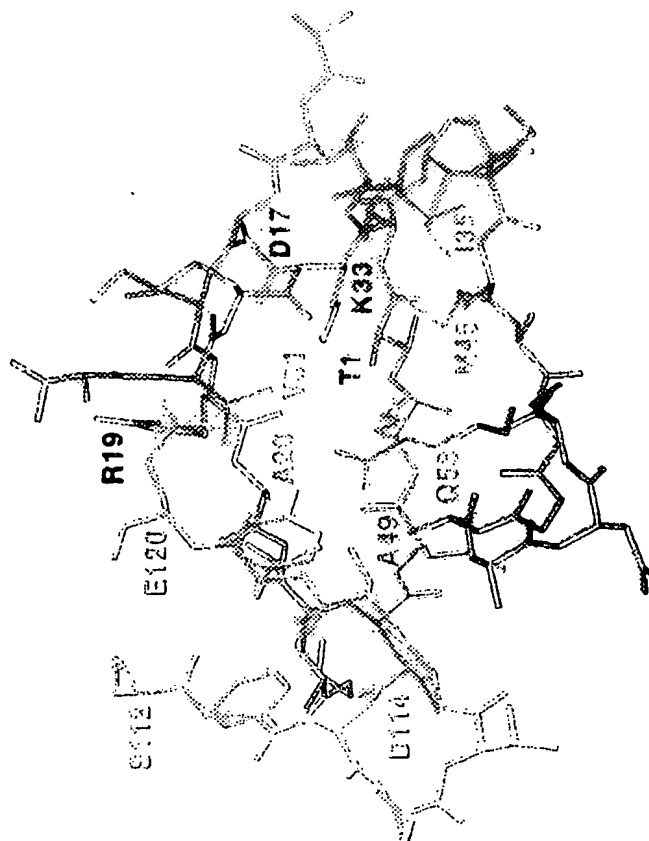
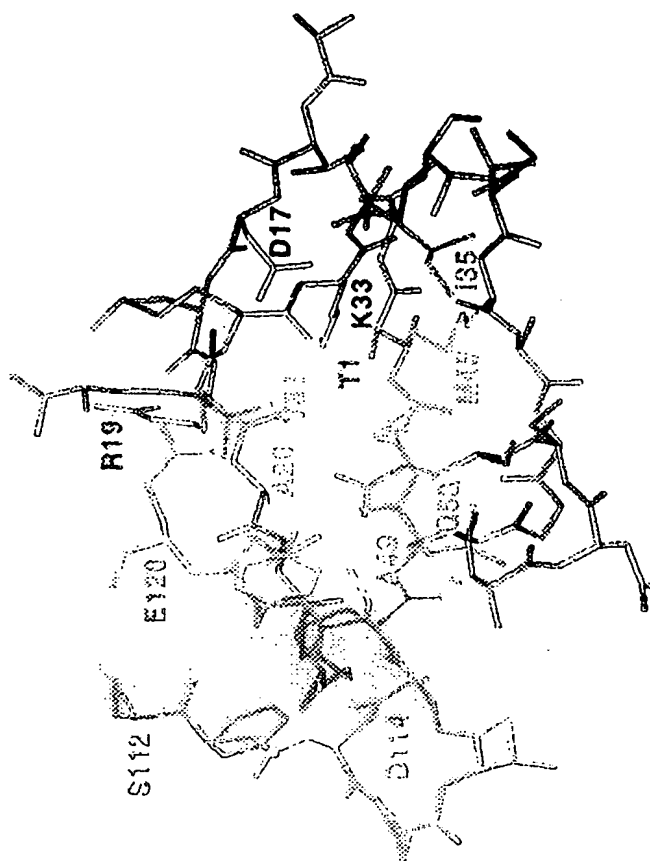
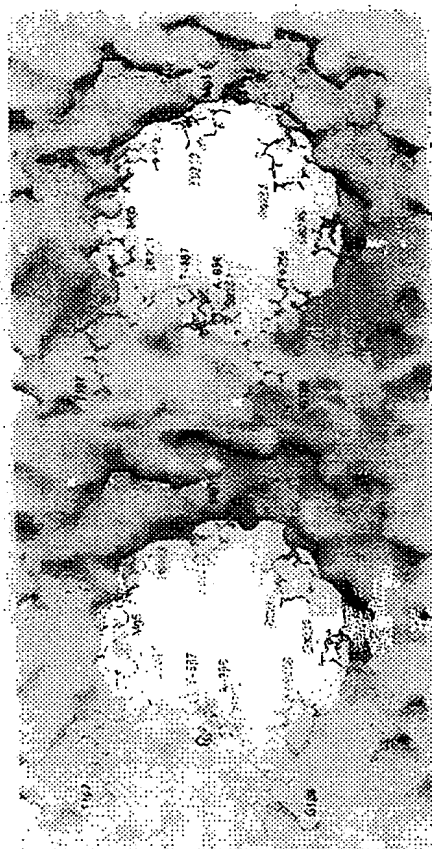


Figure 6b

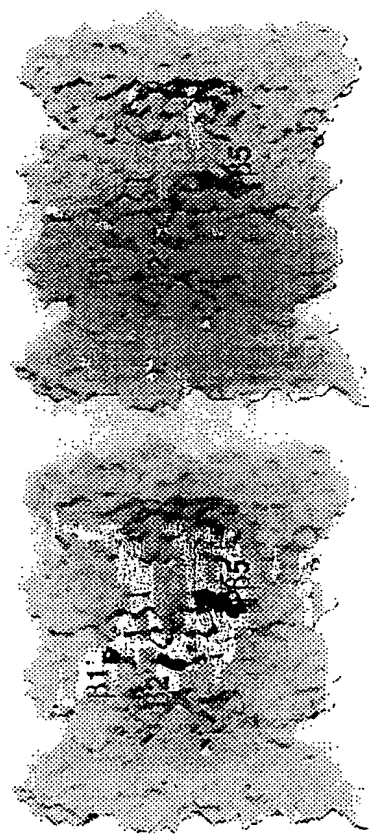
9/11



Figur 6c



Figur 7



Figur 8